

THESIS / THÈSE

MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE

Caractérisation du système de sécrétion de type IV chez *Caulobacter Crescentus*

de Rop, Céline

Award date:
2009

Awarding institution:
Université de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR

Faculté des Sciences

**CARACTERISATION DU SYSTEME DE SECRETION DE TYPE IV CHEZ
*CAULOBACTER CRESCENTUS***

**Mémoire présenté pour l'obtention
du grade académique de master en Biochimie et Biologie moléculaire et cellulaire**

Céline DE ROP

Janvier 2009

Caractérisation du système de sécrétion de type IV chez *Caulobacter crescentus*

DE ROP Céline

Résumé

Au cours de l'évolution, les procaryotes ont acquis différents mécanismes leur permettant de s'adapter au milieu environnant que celui-ci soit intra- ou extra-cellulaire.

Parmi ceux-ci, les systèmes de sécrétion permettent le transport de protéines à travers l'enveloppe bactérienne. Chez de nombreuses gram-négatives, le système de sécrétion de type IV, encodé par un opéron composé de 11 gènes *virB*, joue un rôle important dans leur virulence et leur symbiose. Suite à des études *in silico*, un homologue de l'opéron codant le système de type IV a été mis en évidence chez *Caulobacter crescentus*. *C. crescentus* est une alphaprotéobactérie modèle couramment utilisée pour répondre à des questions relatives au cycle cellulaire et à la morphogénèse. Grâce à ce modèle, nous espérons identifier de nouveaux partenaires structuraux et régulateurs de la voie de sécrétion de type IV.

Dans ce mémoire, avant d'entamer un crible visuel, nous avons localisé deux composants de la voie de type IV chez *C. crescentus* : VirB4 et VirB6. L'observation a mis en évidence des divergences de localisation entre les cellules pour une même protéine fusionnée et entre les deux protéines. En effet, pour ces deux protéines, un ou plusieurs foci ont été visualisés à différentes positions. Ces foci fluorescents se situent soit au centre, soit au pôle ou encore tout le long de la surface de la bactérie. Ces premières observations doivent être confirmées en intégrant *gfp-virB4* et *mcherry-virB6* au locus de *C. crescentus*. De plus, la fonction du système de sécrétion de type IV chez *C. crescentus* est inconnue et nécessite d'être caractérisée par la création d'un délétant de l'opéron codant la voie de type IV.

Mémoire de master en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire

Janvier 2009

Promoteur: J.-Y. Matroule

Liste des abréviations

Abréviations	Noms complets
ADN	Acide désoxyribonucléique
ATP	Adénosine triphosphate
EPS	Exopolysaccharide
Sec	<i>Secretory pathway</i>
ABC (transporteur)	<i>ATP-Binding Cassette</i>
TMD	<i>Transmembrane Domain</i>
NBD	<i>Nucleoside-Binding Domain</i>
OMP	<i>Outer Membrane Protein</i>
SRP	<i>Signal Recognition Particule</i>
Tat	<i>Twin-Arginine Translocation</i>
Gsp	<i>General Secretory Pathway</i>
Ti	<i>Tumor inducing</i>
T-DNA	ADN de transfert
NLS	<i>Nuclear Localization Signal</i>
BCV	<i>Brucella-Containing Vacuole</i>
pb	Paires de base
GFP	Green Fluorescent Protein
Amp	Ampicilline
Kan	Kanamycine
LB	Lubia Bertani
kDa	kiloDalton
PYE	Peptone Yeast Extract
rpm	Rotations par minute

Je tiens vivement à remercier Monsieur Matroule, le promoteur de ce mémoire, pour m'avoir accueillie au sein de son équipe, pour sa patience et ses conseils au cours de cette année.

Un grand merci aussi à Aurore qui a dû me supporter pendant 205 jours [*environ ^^*]. Merci d'avoir été aussi patiente et de m'avoir appris la vie en laboratoire. Tu es libre maintenant [*ha non il reste encore la présentation orale*]. Bien sûr, je n'oublie pas Sophie qui a toujours été de bons conseils lors de nos petits [*hum ^^*] problèmes de manips.

Merci aux autres mémorants de l'URBM grâce à qui cette année restera gravée dans les mémoires : Aurélie [*la fan des vampires maquillés mais également une incroyable gossip girl [et non ce n'est pas comme moi]*], Mike [*notre massive music quizz*], Céline [*la douée des mathématiques capable de résoudre n'importe quel problème*] et Caro [*la fille qui ne dit jamais une insulte [quoique elle ait craqué ces derniers jours...]*].

Evidemment, ces 6 années n'auraient pas été les mêmes sans Guillaume Marguerite, Lady Pepito et Miss Sophie. Merci pour les après-midi « regardons Guillaume repeindre son mur » et les soirées « racontons nos vies en détails » et chaque fois en étant bien accompagnés [*oui ceci était un message codé ou pas*]. Comme prévu, rendez-vous dans 6 mois sur la plage Barcelonaise =D.

Merci aussi à tous les autres biologistes pour ces soirées et ces fous rires. On ne pourra pas dire que nous n'avons pas profité de nos vies d'étudiants. Et bien sûr un grand merci à Benoît pour m'avoir supportée pendant 2 ans mais aussi pour avoir toujours répondu présent quand j'en avais besoin [*on se voit à Valence dans quelques semaines ^^*].

Merci également à tous les URBMiens pour leur accueil et leur gentillesse. Grâce à vous, je n'ai jamais regretté mon choix de labo pour mon mémoire. Et puis grâce, entre autre, à DD et GG j'ai découvert le Cap30 [*et n'y retournerai pas de sitôt*].

Je remercie d'avance Mesdames Renard, Muys et Pastoret et Monsieur Mignolet pour le temps consacré à la lecture de ce mémoire.

Enfin, un grand merci à mes parents pour m'avoir empêchée de suivre des études de coiffure, sans quoi je n'aurais pas pu révolutionner la science [*enfin plutôt « ne pourrai pas dans un avenir lointain »*]. Merci également à ma sœur Coralie même si on ne la voit pas souvent [*heureusement que msn est là ^^*]. Et un tout grand merci à ma grand-mère pour avoir lu et corrigé l'orthographe des 55 pages qui vont suivre [*et qui aurait sûrement préféré que je devienne coiffeuse*].

Introduction

Le règne le plus important sur Terre est sans conteste celui des procaryotes. Des fossiles de bactéries ont été découverts témoignant de la première vie, il y a 3,4 milliard d'années. Les procaryotes sont des cellules uniques et rassemblent les archaebactéries et les eubactéries. Ils sont les ancêtres des eucaryotes dont les premières cellules apparurent il y a 1,9 milliard d'années. Une microbiologiste américaine, Lynn Margulis, proposa sa théorie endosymbiotique dans les années 1960. Celle-ci suggérait que les cellules eucaryotes étaient le résultat d'une association symbiotique entre procaryotes. Au cours de l'histoire, les bactéries ont continué à se développer parallèlement aux eucaryotes. Ils ont ainsi acquis différents mécanismes leur permettant de survivre et de se répliquer dans le milieu environnant qu'il soit extracellulaire ou intracellulaire.

Les procaryotes peuvent se diviser en deux groupes en fonction de la constitution de leur enveloppe cellulaire. Tout d'abord, il y a les bactéries à Gram positif dont l'enveloppe est constituée d'une membrane cytoplasmique, d'un espace périplasmique et d'une couche de peptidoglycane à la surface. Ensuite, il y a les bactéries à Gram négatif dont l'enveloppe est constituée d'une membrane cytoplasmique, d'un espace périplasmique, d'une couche de peptidoglycane, d'un nouvel espace périplasmique et d'une seconde membrane recouvrant l'entièreté de la bactérie. Lors de la description des différents types de système de sécrétion, différents termes seront utilisés. Il est donc important de noter que la sécrétion est le transport d'une protéine du périplasma vers le milieu externe. Alors que la translocation fait référence au transport à travers les membranes biologiques et l'exportation au transport du cytoplasme vers le périplasma.

I. La sécrétion chez les procaryotes

Au cours de l'évolution, les cellules procaryotes et eucaryotes ont acquis différents mécanismes leur permettant d'interagir avec d'autres cellules et avec leur environnement.

Chez les eucaryotes, le transport de protéines permet des interactions entre, par exemple, les organes. La sécrétion joue un rôle de messager dans l'ensemble de l'organisme grâce aux hormones. Celles-ci ont pour rôle de réguler l'activité d'un ou plusieurs organes en modifiant les comportements et les interactions entre eux-ci. Par exemple, l'insuline stimule la synthèse du glycogène dans le foie et les muscles en fonction de la concentration en glucose dans le sang.

Chez les procaryotes, la sécrétion de protéines seules ou de complexes ADN-protéine se fait entre le cytoplasme et le milieu externe qui peut être le milieu environnant ou une cellule cible. Les rôles des systèmes de sécrétion chez les microorganismes sont, par exemple, la biogenèse d'appendices à la surface de la bactérie, la formation de biofilm mature, la libération de facteurs de virulence dans le cas de pathogènes et le transfert horizontal de matériel génétique.

I.1. Les structures à la surface bactérienne

La sécrétion joue un rôle dans la biogenèse d'appendices à la surface de la bactérie tels que le flagelle, les pili, la couche S, le pédoncule ou le glycocalyx. Ceux-ci permettent aux microorganismes de se déplacer dans un milieu, de s'attacher à une surface, d'interagir avec des cellules environnantes de façon symbiotique ou pathogénique ou encore de protéger la bactérie de l'environnement externe.

L'appendice bactérien le mieux connu est le flagelle. Celui-ci permet à la bactérie de se déplacer dans un milieu liquide grâce à un mouvement rotationnel ou de sécréter des facteurs de virulence dans une cellule suite à un contact physique (Journet, Hughes et al. 2005; Kaiser 2007; Pelicic 2008). Le flagelle est un complexe multiprotéique constitué d'un corps basal, d'un coude et d'un filament (Fig.1). Le corps basal est inséré dans l'enveloppe bactérienne et sert de moteur à la rotation du flagelle. Le coude se trouve à l'extérieur de la cellule et sert de jonction entre le corps basal et le filament. Ce dernier s'étend à la surface de la bactérie et permet à celle-ci de se déplacer (Minamino, Imada et al. 2008). Une force proton motrice à travers la membrane cytoplasmique fournit l'énergie nécessaire à la rotation du flagelle (Aldridge and Hughes 2002).

Les pili sont des appendices plus petits et plus fins que le flagelle (Fig.2). Ils permettent l'attachement du microorganisme à une surface abiotique ou à une cellule hôte ainsi que le transport de matériel génétique (Pelicic 2008). Les pili sont constitués de plusieurs sous-unités nommées pilines qui, une fois à l'extérieur de l'enveloppe bactérienne, se polymérisent en pili. Les pilines peuvent également s'assembler à d'autres protéines telles que des adhésines. Celles-ci permettent l'interaction entre la bactérie et les membranes procaryotiques et eucaryotiques pouvant jouer un rôle dans la pathogenèse et la symbiose (Fronzes, Remaut et al. 2008).

Afin de se protéger contre les parasites et les enzymes lytiques présents dans l'environnement externe, certains microorganismes synthétisent une couche S à leur surface (Fig.3). Celle-ci leur permet également de résister à un faible pH, d'adhérer, de stabiliser les membranes et joue le rôle de site d'adhésion pour les exoprotéines. Cette couche S est composée de plusieurs copies d'une seule protéine ou de glycoprotéines qui polymérisent et entourent l'entièreté de la bactérie (Awram and Smit 1998).

I.2. Les biofilms et la colonisation bactérienne

Un biofilm est une communauté d'organismes attaché à une surface marquant le passage d'un organisme planctonique libre en une communauté d'organismes de la même espèce ou d'espèces différentes attachée à une surface biotique ou abiotique (O'Toole, Kaplan et al. 2000). Ces communautés multicellulaires ont été découvertes pour la première fois dans des systèmes aquatiques.

Plusieurs signaux environnementaux initient la formation d'un biofilm. Parmi ceux-ci, on retrouve tout d'abord la présence d'une source en nutriments mais également la température, l'osmolarité, le pH ou une source d'oxygène (O'Toole, Kaplan et al. 2000). La formation d'un biofilm débute par l'attachement de cellules à une surface formant ainsi une monocouche de cellules (Verstraeten, Braeken et al. 2008). Ensuite, d'autres organismes de la

même espèce ou d'une espèce différente s'assemblent à cette monocouche au moyen d'interactions cellule-cellule jusqu'à formation d'un biofilm mature. Sous cette forme, certaines propriétés peuvent être nécessaires telles que la sécrétion de polysaccharides (EPS), le développement de résistances aux antibiotiques, une augmentation de la résistance aux UV ou une augmentation des échanges génétiques (O'Toole, Kaplan et al. 2000). Enfin, suite à des changements environnementaux tel que un épuisement de la source en nutriment, les microorganismes se détachent et repassent à un mode de vie planctonique mobile avec l'aide d'un flagelle (Fig.4) (Verstraeten, Braeken et al. 2008).

I.3. La virulence bactérienne

La virulence d'un pathogène dépend de sa capacité à s'adapter dans sa cellule hôte. En effet, il doit être capable de supporter les conditions abiotiques du milieu tels que la température ou l'acidité. Il doit également éviter le système immunitaire de l'hôte. Dans le but de survivre et de se répliquer intracellulairement, les bactéries pathogènes ont développé divers mécanismes tels que la résistance aux agents antimicrobiens (*Pseudomonas aeruginosa*), le détournement du trafic intracellulaire (*Brucella* spp.) ou encore le réarrangement du cytosquelette (*Helicobacter pylori*) (Celli 2006; Backert and Selbach 2008). Tous ces mécanismes nécessitent l'utilisation d'un système de sécrétion particulier afin de libérer des protéines qui permettent à la bactérie de se répliquer et d'infecter la cellule hôte.

Ces différentes caractéristiques (appendices, biofilm et virulence) permettent l'interaction entre la bactérie et le milieu externe via un échange de protéines ou de complexes ADN-protéines. Ceux-ci doivent donc traverser l'enveloppe bactérienne via des systèmes de sécrétion particuliers. Par exemple, l'exportation des protéines formant la couche S à la surface de la bactérie se fait via le système de sécrétion de type II. A ce jour, sept systèmes de sécrétion ont été découverts (type I – VII) chacun ayant leurs propres caractéristiques structurales et fonctionnelles.

II. Les systèmes de sécrétion bactériens

Les systèmes de sécrétion de type I à VII permettent la translocation de protéines ou de complexes ADN-protéine à travers l'enveloppe bactérienne. Ce transport peut se faire en une ou deux étapes avec l'aide de la voie Sec. Cette voie permet l'exportation du précurseur du cytoplasme vers le périplasme et une autre voie permet ensuite la sécrétion de la protéine du périplasme vers le milieu externe. Parmi les voies en deux étapes, donc dépendantes de la voie Sec, on retrouve les systèmes de sécrétion de type II, IV et V. Parmi les voies indépendantes de la voie Sec et permettant donc un transport direct de la protéine du cytoplasme vers le milieu externe, on retrouve les systèmes de sécrétion de type I, III et VI (Fig.5). Le système de sécrétion de type VII est une voie particulière retrouvée chez les champignons et qui permet la translocation de protéines à travers une mycomembrane (Abdallah, Gey van Pittius et al. 2007).

II.1. Les systèmes de sécrétion Sec indépendants

II.1.1. Le système de sécrétion de type I

Le système de sécrétion de type I est une voie indépendante de la voie Sec mais dépendante d'un ABC transporteur. Ce système est présent chez un grand nombre de bactéries à Gram négatif et permet la translocation du cytoplasme vers le milieu externe de protéines de tailles et de fonctions variées tels que des polysaccharides, de l'acide sialique et des petits peptides (Holland, Schmitt et al. 2005). Cette voie a été découverte pour la première fois chez des *Escherichia coli* uropathogènes pour la sécrétion de l'hémolysine (Delepelaire 2004). Cette protéine a pour cible différents types cellulaires et possède un effet cytotoxique et hémolytique c'est-à-dire la destruction des globules rouges (Emody, Kerenyi et al. 2003).

Les protéines sécrétées par la voie de type I possèdent un peptide signal localisé généralement du côté C-terminal permettant leur reconnaissance dans le cytoplasme en membrane interne. Les substrats sont donc transportés de façon post-traductionnelle. Cette voie est composée de trois protéines localisées dans l'enveloppe cellulaire (Holland, Schmitt et al. 2005). Tout d'abord, nous avons du côté de la membrane interne un ABC transporteur possédant un domaine de liaison à l'ATP. Ce domaine a pour rôle la reconnaissance du substrat via son peptide signal et il fournit également l'énergie nécessaire à la translocation du substrat grâce à son activité ATPase (Delepelaire 2004). Ensuite, une protéine de fusion membranaire (MPF) permet d'établir un lien entre la membrane interne et la membrane externe (Delepelaire 2004). Enfin, un trimère de protéines membranaires externes (OMP) complète le système (Holland, Schmitt et al. 2005).

Le substrat associé à une chaperonne se lie via son peptide signal dépendamment du complexe transporteur – translocon. Suite à cette interaction, on observe une réorganisation du domaine périplasmique des molécules du translocon afin de permettre l'ancrage du MPF en membrane interne et externe. La liaison d'un ATP à l'ABC transporteur fournit l'énergie nécessaire à la translocation du substrat à travers le canal et donc sa libération dans le milieu extérieur (Fig.6). Après le passage du précurseur, le complexe transporteur – translocon et OMP se séparent (Gentshev, Dietrich et al. 2002). Lorsque le substrat atteint la surface de la bactérie, le peptide signal n'est pas clivé et intervient dans le repliement de la protéine (Holland, Schmitt et al. 2005).

II.1.2. Le système de sécrétion de type III

Le système de sécrétion de type III est indépendant de la voie Sec. Le transport des protéines du cytoplasme vers l'extérieur de la bactérie se fait donc en une seule étape. Cette voie est couramment appelée injectisome car elle permet la libération d'effecteurs dans le cytoplasme des cellules hôtes au moyen d'une structure externe en forme d'aiguille (Mueller, Broz et al. 2008). Ce système est très répandu chez les symbiontes et les pathogènes de végétaux et d'animaux. Cette voie est constituée d'un corps basal en membrane interne et d'une aiguille à la surface de la bactérie (Cornelis 2006). Celle-ci est composée de plusieurs copies d'une même protéine de 9 kDa (Blocker, Deane et al. 2008). Au bout de cette structure se trouve un complexe contenant plusieurs copies d'une protéine adaptatrice. Celle-ci permet de réguler le système de translocation et l'insertion du pore à la surface eucaryotique, le translocon (Cornelis 2006).

L'injectisome possède des homologies de séquence et des similarités structurales avec le flagelle (Fig.7). Celui-ci est une organelle mobile qui permet à la bactérie de se déplacer dans le milieu grâce à un mouvement rotationnel. Un système de sécrétion homologue au système de type III exporte les sous-unités composant le flagelle et qui se polymérisent à la surface de la bactérie (Kaiser 2007). En plus des protéines flagellaires, il transloque d'autres protéines nécessaires à l'élaboration du flagelle telle qu'une muramidase et des protéines de régulation (Journet, Hughes et al. 2005).

La sécrétion à travers le système de type III est activée suite à un contact direct avec la cellule cible (Journet, Hughes et al. 2005). Le ciblage des substrats dans le cytoplasme peut se faire par l'intermédiaire de chaperonnes qui reconnaissent la séquence signal du côté N-terminal des facteurs de virulence (Aldridge and Hughes 2001). Ces protéines effectrices sont alors escortées vers la voie de type III qui leur permet de traverser l'enveloppe bactérienne jusque dans la cellule hôte en une seule étape. Une fois à l'extérieur de la bactérie, la protéine se replie et la séquence signal n'est pas clivée (Journet, Hughes et al. 2005).

Le système de sécrétion de type III le plus étudié est celui des espèces *Yersinia*. Les protéines effectrices sont (i) des protéines impliquées dans le processus de translocation (YopB, YopD, YopK et YopR), (ii) des protéines régulant l'induction dépendante du contact cellulaire de la traduction et de l'expression des protéines Yop (YopN, LcrG, LcrV et LcrQ) et (iii) des protéines de virulence sécrétées directement dans les cellules eucaryotes tels que la cytotoxine YopE, la tyrosine phosphatase YopH, le facteur se liant à la thrombine YopM et la protéine kinase YpkA (Journet, Hughes et al. 2005).

II.2. Les systèmes de sécrétion Sec dépendants

II.2.1. La voie Sec

Chez les procaryotes, les protéines sécrétées par les systèmes de sécrétion de type II, IV et V nécessitent l'aide de la voie Sec pour l'exportation de substrats au travers de la membrane interne. La voie Sec est, sur base d'homologie de séquences, très conservée parmi les procaryotes et les eucaryotes (Economou 1999).

La voie Sec peut être divisée en 3 parties distinctes, consécutives et interdépendantes : la reconnaissance du précurseur de la protéine, son exportation à travers la membrane interne et sa libération dans le périplasme (Economou 1999).

II.2.1.1. La reconnaissance du précurseur

Afin d'être reconnu dans le cytoplasme et amené à leur système de sécrétion en membrane interne, les substrats doivent contenir un peptide signal à leur extrémité C-terminale ou N-terminale. Ces motifs présentent une certaine hétérogénéité au niveau de la longueur et de la séquence bien que les principales caractéristiques structurales et physicochimiques soient bien conservées parmi les organismes. Lorsque la protéine est sécrétée, le peptide signal peut être clivé par une peptidase (Stephenson 2005).

La voie Sec peut transporter des protéines qui s'insèrent dans la membrane interne ou qui sont libres dans le périplasme (Stephenson 2005). La reconnaissance du peptide signal du substrat en membrane interne peut se produire de manière co-traductionnelle par la SRP (*signal-recognition particule*) ou de manière post-traductionnelle par une chaperonne

cytosolique SecB (Economou 1999). La SRP se lie au peptide signal de la protéine naissante tandis que SecB se lie à la partie mature de la protéine afin d'empêcher son repliement dans le cytoplasme (Rusch and Kendall 2007). Une autre caractéristique qui différencie la voie SRP et SecB est le type de protéines transportées. En effet, la SRP reconnaît préférentiellement des protéines membranaires internes et des protéines périplasmiques très hydrophobes alors que SecB reconnaît principalement des protéines périplasmiques (Stephenson 2005).

II.2.1.2. L'exportation et la libération du substrat dans le périplasma

L'exportation du substrat est catalysée par une translocase (Fig.8). Celle-ci est un hétérotrimère SecYEG ancré dans la membrane interne et lié à une ATPase (Economou 1999). Au niveau de la membrane interne, l'ATPase FtsY va permettre la libération du peptide par la SRP et son transport au travers de la translocase (Stephenson 2005). Le complexe SecB/protéine sera pris en charge par SecA, une ATPase, au niveau de la membrane interne (Economou 1999). L'activité ATPase de SecA fournit l'énergie nécessaire à la translocation du précurseur de la protéine (Rusch and Kendall 2007).

Lorsqu'elle se trouve dans le périplasma, la protéine reconnue par la SRP se replie et peut soit (i) rester une protéine périplasmique soit (ii) être sécrétée dans le milieu externe par un autre système de sécrétion (type II, IV ou V) soit (iii) s'insérer dans la membrane interne via la protéine YidC (Rusch and Kendall 2007). Après exportation de la protéine périplasmique reconnue par SecB, SecA est recyclée afin de récupérer un nouvel ATP et une peptidase, Lep, clive le peptide signal permettant à la protéine de se replier (Economou 1999).

Deux protéines accessoires sont également présentes dans la voie Sec : SecD et SecF. Elles jouent un rôle (i) dans le recyclage de SecA, (ii) dans l'assemblage correct du translocon et (iii) dans le mécanisme de contrôle de qualité (Berks, Palmer et al. 2003). Ce dernier permet la dégradation de protéines non repliées ou dont le peptide signal n'a pas été clivé afin de s'assurer que seulement les protéines avec une bonne conformation atteignent leur destination finale (Stephenson 2005).

Aujourd'hui, une autre voie permettant l'exportation des protéines sécrétées dans le périplasma est étudiée chez les bactéries : la voie Tat (*Twin-Arginine Translocation*) (Berks, Sargent et al. 2000; Berks, Palmer et al. 2003; Stephenson 2005). Cette voie, contrairement à la voie Sec, permet l'exportation de protéines matures repliées (Berks, Palmer et al. 2005). Le système Tat est un complexe inséré dans la membrane interne et formé de 3 types protéiques nommés TatA, TatB et TatC (Berks, Palmer et al. 2003). Le transport à travers cette voie se fait grâce à l'énergie fournie par un gradient électrochimique transmembranaire (Berks, Palmer et al. 2003).

Le système Sec intervient dans la translocation de substrats par les systèmes de type II, IV et V qui exportent les substrats en deux étapes. La première étape permet l'exportation du substrat par la voie Sec dans le périplasma. La seconde étape est la sécrétion de la protéine mature du périplasma vers le milieu externe par la voie de type II, IV ou V (Henderson, Navarro-Garcia et al. 2004).

II.2.2. Le système de sécrétion de type II

Le système de sécrétion de type II permet la sécrétion de protéines matures dans le milieu externe. Cette voie est dépendante de la voie Sec qui permet dans un premier temps l'exportation des substrats du cytoplasme vers le périplasma. Ensuite, la voie de type II permet la sécrétion de protéines du périplasma vers l'extérieur de la cellule. Le système de type II est bien conservé parmi les bactéries à Gram négatif et plus particulièrement parmi les gammaprotéobactéries (Filloux 2004; Cianciotto 2005). Cette voie est constituée de 12 à 16 types protéiques en fonction des espèces et dont les gènes sont organisés sous la forme d'un large opéron nommé *gsp* (*General Secretory Pathway*).

Au niveau de la membrane interne se trouve les protéines GspL, GspF et GspM qui forme une plate-forme permettant l'insertion de GspE, une ATPase (Cianciotto 2005). Celle-ci sera activée lors de la liaison de SecA avec le substrat de la voie de type II (Filloux 2004).

Ensuite, le pseudopilus qui, s'étend à travers le périplasma, participe à la sécrétion des protéines à travers la membrane externe (Johnson, Abendroth et al. 2006). Le nom pseudopilus a été donné à cette fibre suite à une analyse de séquences. En effet, les composants de la voie de type II possèdent des homologies avec plusieurs composants impliqués dans la biogenèse du pilus de type IV (Fig.9) (Johnson, Abendroth et al. 2006). Le pseudopilus est composé de pseudopilines nommées GspG, GspH, GspI, GspJ et GspK (Cianciotto 2005).

Au niveau de la membrane externe se trouve la sécrétine, GspD, qui permet l'expulsion des protéines dans le milieu externe. La sécrétine est multimérique et constituée de 12 à 15 sous-unités. Elle forme un canal de grande taille permettant aux exoprotéines d'être transloquées sous forme repliée (Filloux 2004). Une seconde protéine, GspC, se trouve insérée dans la membrane externe. Celle-ci possède un domaine permettant une interaction protéine-protéine avec GspD (Cianciotto 2005). Lorsque l'interaction entre GspC et la sécrétine n'est plus présente, les exoprotéines entrent dans la voie de type II et traversent la membrane externe (Filloux 2004).

Le système de sécrétion de type II a été découvert pour la première fois chez *Klebsiella oxytoca* (Filloux 2004). Par la suite, ce système a été découvert chez des bactéries pathogènes telles que des parasites d'humains, d'autres animaux à sang chaud, de poissons et de plantes. La voie de type II permettrait l'exportation d'enzymes de dégradation provoquant des dommages sur les cellules et les tissus de l'hôte. Le système de type II est également présent chez certaines bactéries non-pathogènes telles que des symbiontes d'animaux ou de plantes (Cianciotto 2005).

II.3. Les autres systèmes de sécrétion

Dernièrement, trois autres systèmes de sécrétion ayant leurs propres caractéristiques ont été découverts. Il s'agit des systèmes de sécrétion de type V, VI et VII (Fig.10).

Le système de sécrétion de type V fait référence aux autotransporteurs car les protéines sécrétées traversent la membrane externe sans l'aide d'une autre protéine. En effet, les substrats de cette voie sont constitués de trois domaines. Premièrement, un motif signal du côté N-terminal qui permet le passage de la protéine dans le périplasma via la voie Sec. Deuxièmement, un domaine passager qui confère les diverses fonctions de l'effecteur et reste

sous une forme non-repliée lors de son passage dans le milieu externe. Troisièmement, un β -domaine du côté C-terminal. Ce dernier forme au niveau de la membrane externe une structure tertiaire en tonneau bêta qui permet l'exportation du substrat dans le milieu extérieur. Une fois à la surface de la bactérie, la protéine peut soit rester liée au β -domaine soit être clivée et rester en interaction avec le domaine en C-terminal via une liaison non-covalente (Henderson, Navarro-Garcia et al. 2004).

Le système de sécrétion de type VI a été découvert chez *Vibrio cholerae*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Salmonella enterica* (Pukatzki, Ma et al. 2007). Chez *Vibrio cholerae* les gènes du système de type VI sont organisés sous la forme d'un opéron et relativement bien conservés chez les bactéries à Gram négatif pathogènes et symbiotiques (Filloux, Hachani et al. 2008). Cette voie est constituée de 12 à 25 types de protéines et est indépendante de la voie Sec. A proximité de l'opéron se trouvent d'autres gènes codant pour deux types protéiques sécrétés par la voie de type VI, Hcp et VgrG. VgrG a pour fonction de lyser l'enveloppe bactérienne et la membrane cellulaire de l'hôte afin de transloquer les effecteurs dont Hcp qui formera un canal jusque dans la cellule hôte (Filloux, Hachani et al. 2008).

Le système de sécrétion de type VII a été découvert chez *Mycobacterium tuberculosis*, une bactérie à Gram positif. Ce pathogène possède une enveloppe cellulaire particulière car elle contient une couche hydrophobe avec une fluidité extrêmement faible appelée mycomembrane sous la capsule externe. Les composants du système de type VII forment un complexe multiprotéique qui traverse l'entièreté de l'enveloppe cellulaire. Les facteurs de virulence tels que ESAT-6 et CFP-10 sont sécrétés sous la forme d'un complexe multimérique et provoquent une perturbation membranaire et l'activation de l'apoptose chez la cellule hôte (Abdallah, Gey van Pittius et al. 2007).

III. Le système de sécrétion de type IV

Le système de sécrétion de type IV est un système ubiquitaire que l'on retrouve parmi un grand nombre de bactéries à Gram positif et Gram négatif mais également chez les archaebactéries (Cao and Saier 2001). Les gènes encodant les composants du système de type IV, *virB-D*, se présentent en général sous la forme d'un opéron *virB* composé de 11 gènes qui encodent les protéines VirB1-B11 et d'un opéron *virD* contenant le gène *virD4* (Cao and Saier 2001). Les 11 protéines VirB et VirD4 ne sont pas nécessaires pour que le système de type IV soit actif. Ainsi, le plasmide F intervenant dans la conjugaison chez *Escherichia coli* ne contient pas *virB1*, *virB8* et *virB11*. Parmi les pathogènes utilisant la voie de type IV pour la translocation d'effecteurs, certains ne possèdent pas tous les composants du système tels que *Helicobacter pylori* (VirB1, B2, B3, B5 et B6) et *Bartonella pertussis* (VirB1, B5 et VirD4). La protéine VirD4 est présente uniquement chez les bactéries utilisant la voie de type IV pour la conjugaison (Fig.11) (Ding, Atmakuri et al. 2003).

Les composants du système de sécrétion de type IV, VirB1-11 et VirD4, forment un complexe multiprotéique qui traverse l'enveloppe bactérienne. Ce complexe permet la translocation de protéines et de complexes ADN-protéine (Lavigne, Botella et al. 2006).

III.1. Structure du système de sécrétion de type IV

Le système de sécrétion de type IV peut être sous-divisé en trois parties : les ATPases, le canal de sécrétion et le pilus (Fig.12). Les trois ATPases (VirB4, VirB11 et VirD4) sont présentes au niveau de la membrane interne du côté cytoplasmique (Lavigne, Botella et al. 2006). Celles-ci serviront à l'assemblage du complexe en plus de fournir l'énergie nécessaire à la sécrétion (Middleton, Sjolander et al. 2005).

Le complexe de sécrétion forme un canal à travers l'espace périplasmique en s'insérant dans la membrane interne et la membrane externe. Celui-ci est composé de VirB6, VirB7, VirB8, VirB9, VirB10 et VirB3. VirB6 et VirB10 sont ancrées dans la membrane interne du côté périplasmique (Cascales and Christie 2003). VirB10 possède des motifs d'interaction protéine-protéine qui lui permet d'interagir avec VirB8, VirB7 et VirB9 (Christie, Atmakuri et al. 2005). De cette façon, VirB10 forme le lien entre les composants de la membrane interne et de la membrane externe (Cascales and Christie 2003). VirB6 est nécessaire pour la formation de l'hétérodimère VirB7-VirB9 intervenant dans l'assemblage de la machinerie au niveau du périplasme et de l'homodimère VirB7-VirB7 intervenant dans l'assemblage du pilus (Judd, Mahli et al. 2005). VirB3 est un autre composant du complexe transmembranaire inséré dans la membrane externe du côté périplasmique (Christie, Atmakuri et al. 2005). Cette insertion du complexe core à travers l'enveloppe bactérienne nécessite l'aide de VirB1. Celle-ci est une transglycosylase qui lyse la couche de muréine afin de faciliter l'assemblage du système de sécrétion au travers de la membrane externe (Mushegian, Fullner et al. 1996).

VirB2 est le composant majeur du pilus (Lai and Kado 1998). Il interagit avec VirB5 un autre composant du pilus (Schmidt-Eisenlohr, Domke et al. 1999). Ces protéines traversent le complexe transmembranaire pour atteindre le périplasme et démarrer leur assemblage en s'associant avec la lipoprotéine VirB7 (Cascales and Christie 2003).

La voie de type IV peut transporter des protéines seules ou des complexes ADN-protéine (Lavigne, Botella et al. 2006). Le transport peut-être dépendant ou indépendant de la voie Sec selon les substrats. Lorsque la voie est dépendante de Sec, les substrats sécrétés sont ciblés dans le cytoplasme et transportés sous forme dénaturée par la voie Sec (Jakubowski, Krishnamoorthy et al. 2004). Lorsqu'ils atteignent le périplasme, ces précurseurs perdent leur peptide signal et traversent la membrane externe par le pilus du système de sécrétion de type IV. Lorsque la voie est indépendante de la voie Sec, la protéine est ciblée dans le cytoplasme par une protéine de couplage, T4CP. Celle-ci amène le substrat à VirB11 du côté cytoplasmique. Celui-ci transfère alors la protéine à VirB6 et VirB8 qui l'amènent à VirB2 et VirB9. Ces derniers terminent l'exportation du substrat à la surface de la bactérie (Jakubowski, Krishnamoorthy et al. 2004; Christie, Atmakuri et al. 2005).

III.2. Les fonctions du système de sécrétion de type IV

Le système de sécrétion de type IV possède plusieurs rôles. Il permet (i) la conjugaison, (ii) la translocation d'effecteurs dans les cellules hôtes et (iii) l'échange de matériel génétique avec le milieu extérieur (Fig.13) (Backert and Meyer 2006).

III.2.1. La conjugaison

La conjugaison permet de délivrer de l'ADN dans une cellule hôte suite à un contact direct entre les 2 cellules. Parmi les bactéries utilisant la voie de type IV pour transférer de l'ADN, on retrouve *Escherichia coli*, *Legionella pneumophila* et *Agrobacterium tumefaciens*. La voie la mieux étudiée est celle d'*Agrobacterium tumefaciens*, un phytopathogène responsable de la tumeur du collet qui se caractérise par une prolifération incontrôlée du tissu de la plante cible (Lavigne, Botella et al. 2006). Ce pathogène possède un plasmide Ti (*Tumor inducing*) contenant le T-DNA (ADN de transfert) (Zupan, Muth et al. 2000). Suite à un contact direct entre la bactérie et la surface de la cellule cible, *A. tumefaciens* initie la synthèse du T-DNA qui est alors transporté dans la cellule hôte sous la forme d'un complexe T-DNA/VirD2/VirE2 via le système de type IV composé des protéines VirB1-11 et VirD4. Une fois dans la cellule cible, les protéines VirE2 et VirD2 sont reconnues par des récepteurs contenant un NLS (*nuclear localization signal*) qui permettent le transport du complexe dans le noyau où le T-DNA est intégré dans le chromosome végétal (Sheng and Citovsky 1996; Zupan, Muth et al. 2000; Guo, Jin et al. 2007).

III.2.2. La translocation d'effecteurs

La translocation d'effecteurs dans le cytosol de la cellule hôte permet leur interaction avec les voies biochimiques. Plusieurs effecteurs, qui nécessitent leur translocation par la voie de type IV, sont connus chez *Helicobacter pylori* (CagA), *Legionella pneumophila* (RalF, DotA, LedA, LedB, LidA), *Bartonella* spp (Bep) et *Bordetella pertussis* (toxine pertussique) (Vogel, Andrews et al. 1998; Lavigne, Botella et al. 2006).

Helicobacter pylori est un pathogène de l'homme pouvant induire des pathologies gastriques telles que des gastrites chroniques, des ulcères peptiques ou encore le cancer (Tanaka, Suzuki et al. 2003). Suite à une interaction entre la bactérie et la cellule hôte, le système de sécrétion de type IV est synthétisé à la surface et permet la translocation de l'effecteur CagA (Tanaka, Suzuki et al. 2003). Celui-ci intervient dans le réarrangement du cytosquelette, l'élongation des cellules infectées, la disruption des jonctions serrées et adhérents et la perte de réponses pro-inflammatoire (Rieder, Fischer et al. 2005).

Legionella pneumophila est l'agent causant la forme fatale de pneumonie appelée maladie du légionnaire. Ce pathogène survit et se réplique dans les macrophages de l'hôte en empêchant la fusion avec le lysosome grâce à un système de sécrétion de type IV qui permet l'exportation d'un grand nombre d'effecteurs tels que DotA, LidA, RalF, LepA et LepB. Par exemple, DotA permettra l'entrée du pathogène dans la cellule hôte et LidA permettra la formation d'un phagosome répliatif afin que le pathogène puisse se répliquer intracellulairement (Vogel and Isberg 1999; Derre and Isberg 2005).

III.2.3. Echange de matériel génétique avec le milieu externe

Le système de sécrétion de type IV peut également sécréter des complexes ADN-protéine dans le milieu extracellulaire sans contact avec une cellule cible. Cette sécrétion peut se faire soit du cytoplasme vers le milieu externe, soit du milieu extracellulaire vers le cytoplasme bactérien (Lavigne, Botella et al. 2006). Actuellement, seules trois bactéries

possédant cette fonction sont connues : *Campylobacter jejuni*, *Helicobacter pylori* et *Neisseria gonorrhoeae* (Bacon, Alm et al. 2000; Dillard and Seifert 2001; Hofreuter, Odenbreit et al. 2001).

Les *Helicobacter pylori* possèdent deux systèmes de transport dépendant de la voie de type IV, un pour la translocation de l'effecteur CagA encodé par l'îlot de pathogénicité *cag* et un pour l'intégration d'ADN par transformation encodé par l'opéron *comB*. Cet opéron code pour quatre protéines qui interviennent dans les différentes étapes permettant le transport de l'ADN venant du milieu externe dans le cytoplasme de la bactérie et son intégration dans le chromosome (Hofreuter, Odenbreit et al. 2001).

Lors d'une infection de *Neisseria gonorrhoeae*, la présence de l'îlot de pathogénicité dans les souches n'est pas nécessaire pour la maladie mais celles-ci sont co-infectées avec des souches contenant l'îlot. Lors d'une croissance exponentielle et suite à la lyse de certaines cellules, l'ADN est libéré dans le milieu et utilisé pour une transformation génétique par les cellules restantes (Dillard and Seifert 2001).

Afin d'augmenter l'efficacité de ces différentes fonctions du système de sécrétion de type IV, une localisation particulière de celui-ci peut être nécessaire. La localisation dépend donc du cycle infectieux de la bactérie. Par la suite, deux localisations différentes de la voie de type IV sont décrites chez *Agrobacterium tumefaciens* et chez *Legionella pneumophila*.

III.3. La localisation du système de sécrétion de type IV

Le système de sécrétion de type IV chez *A. tumefaciens* se met en place suite à un contact direct avec la cellule hôte (Sheng and Citovsky 1996). Lorsque le contact est établi, les composants de la voie de type IV se regroupent au pôle de la cellule afin de permettre l'élaboration du canal de sécrétion et du pilus par lequel le T-DNA est transféré dans le cytoplasme de l'hôte. Grâce à la microscopie à immunofluorescence, la localisation de 10 des 11 protéines VirB (VirB1, B3-B11) ainsi que VirD4 a été mise en évidence (Fig.14). Suite à un contact direct avec la cellule hôte végétale, les protéines du complexe s'assemblent au même site de la membrane cellulaire. Les premières protéines à se localiser au pôle sont VirB8, B3 et D4. Ensuite, les protéines VirB6, B7, B9 et B10 se colocalisent avec les protéines déjà présentes afin de former le complexe transmembranaire du système de sécrétion de type IV. Trois autres protéines de la voie de type IV, VirB4, B5 et B11, ne colocalisent pas avec VirB8 et donc le complexe. Ces protéines se trouvent au même pôle mais à différentes régions de celui-ci. VirB4 et VirB11 sont des ATPases qui fourniront l'énergie nécessaire à la translocation du substrat tandis que VirB5 est un des composants du pilus (Judd, Kumar et al. 2005; Judd, Kumar et al. 2005).

La localisation de la machinerie de type IV a également été observée chez *Legionella pneumophila* (Fig.15). Les protéines DotH et DotO de la voie de type IV sont sécrétées lors du cycle infectieux de la bactérie à la surface de celle-ci afin de former une structure fibreuse sur l'ensemble de la cellule. Ces protéines jouent un rôle essentiel dans la croissance intracellulaire et l'évasion de la voie endocytaire. Leur expression à la surface de la bactérie dépend de leur étape dans le cycle intracellulaire de *L. pneumophila*. En effet, lors de l'entrée de la bactérie dans le macrophage, la structure fibreuse est présente. Ensuite, cette structure disparaît lors du début de la réplication intracellulaire qui se produit rapidement. Suite à une augmentation importante du nombre de bactéries dans la vacuole, la réplication de celle-ci

diminue et s'arrête. En réponse à ces conditions, la surface de la bactérie change et le complexe de type IV est à nouveau exprimé. Les protéines exportées par la voie de type IV provoquent la lyse du macrophage et la libération des *Legionella* qui peuvent alors infecter les cellules avoisinantes entamant un nouveau cycle (Watarai, Andrews et al. 2001).

Le système de sécrétion de type IV est largement distribué parmi les bactéries à Gram négatif pathogènes telles que *Agrobacterium tumefaciens*, *Bordetella pertussis*, *Brucella* spp., *Campylobacter jejuni*, *Legionella pneumophila* et *Rickettsia prowazekii*. Cependant, un homologue de l'opéron codant pour la voie de type IV a été découvert chez l'espèce non pathogène *Caulobacter crescentus*. Cette bactérie a l'avantage d'être facilement manipulable et son génome a été entièrement séquencé. Elle représente donc un bon modèle pour l'étude du système de sécrétion de type IV.

IV. *Caulobacter crescentus*

Caulobacter crescentus est une bactérie à Gram négatif aquatique faisant partie de α -protéobactéries (Fig.16) (Goley, Iniesta et al. 2007). Cet ordre comprend des symbiontes de plantes et d'animaux ainsi que des espèces pathogènes tels que *Brucella* spp, *Agrobacterium tumefaciens*, *Rickettsia prowazekii* et *Sinorhizobium meliloti* (Skerker and Laub 2004). Les *Brucella* sont des pathogènes intracellulaires provoquant la brucellose chez un grand nombre de mammifères tels que le bétail et les humains. Cette bactérie survit et se réplique intracellulairement dans les cellules infectées telles que les macrophages en détournant le trafic endocytaire et en s'établissant dans une BCV (*Brucella-containing vacuole*) (Celli and Gorvel 2004). Elle possède un système de type IV qui joue un rôle important dans la maturation de cette BCV en une organelle répliquative pour le pathogène (Delrue, Deschamps et al. 2005). *Agrobacterium tumefaciens* est un phytopathogène provoquant la tumeur du collet. Cette bactérie transloque via un pilus de type IV un T-DNA dans la cellule de l'hôte (Zupan, Muth et al. 2000). *Rickettsia* spp sont des bactéries intracellulaires obligatoires de nombreux animaux et de l'homme dans le cas de *Rickettsia prowazekii* (Wisseman, Edlinger et al. 1976; Zomorodipour and Andersson 1999). *Sinorhizobium* est un symbionte de légumineuse permettant la fixation du nitrogène (Jones, Kobayashi et al. 2007).

Caulobacter est ubiquitaire et n'est pas pathogène pour l'Homme. Cette bactérie est un modèle utilisé pour analyser les régulations du cycle cellulaire procaryotique (Nierman, Feldblyum et al. 2001). En effet, elle se divise asymétriquement menant à deux cellules filles morphologiquement et physiologiquement distinctes. De plus, elle est facilement manipulable en laboratoire que cela soit pour des techniques en génétique, biochimie, biologie moléculaire et des approches protéomiques (Skerker and Laub 2004). Un autre avantage dans l'utilisation de *Caulobacter crescentus* en laboratoire est que le génome de celle-ci a été entièrement séquencé. Il est constitué d'un chromosome circulaire constitué de ~4 Mb et de 3767 gènes qui contient plusieurs clusters de gènes codant pour des protéines essentielles pour la survie dans un environnement pauvre en nutriments (Nierman, Feldblyum et al. 2001).

IV.1. La division asymétrique

Une des caractéristiques particulières de *C. crescentus* est sa division asymétrique menant à deux cellules morphologiquement et fonctionnellement distinctes : une petite cellule

flagellée pouvant se déplacer librement dans le milieu et une grande cellule pédonculée qui adhère aux surfaces grâce à une organelle adhésive à son extrémité nommée holdfast (Fig.17) (Goley, Iniesta et al. 2007). La petite cellule possède un flagelle lui permettant d'être mobile et des pili de type IV lui permettant de se fixer sur des surfaces abiotiques et biotiques. Cette cellule ne peut se répliquer et doit passer par une étape de différenciation. Durant cette étape, le flagelle est dégradé et les pili se rétractent. Par la suite, la cellule s'allonge et un pédoncule est élaboré au pôle où se trouvait le flagelle (Skerker and Laub 2004). Celui-ci porte une extrémité adhésive lui permettant d'adhérer à une surface. La cellule pédonculée peut alors entamer la réplication de l'ADN. Celle-ci s'initie à une simple origine et se poursuit de façon bidirectionnelle tandis que la cellule s'allonge en une cellule prédivisionnelle avec un pédoncule à un pôle et un flagelle au pôle opposé. Une fois la réplication de l'ADN terminée, les 2 chromosomes filles ségrégent vers chaque cellule fille et la cytokinèse se termine. La cellule pédonculée peut directement entamer un nouveau cycle de réplication contrairement à la cellule flagellée (Goley, Iniesta et al. 2007).

IV.2. Les systèmes de sécrétion chez *Caulobacter crescentus*

Le génome de *C. crescentus* possède un système de sécrétion de type I. Celui-ci permet l'exportation de protéines formant la couche S à la surface de la bactérie habituellement sécrétées par le système de sécrétion de type II chez la plupart des bactéries à Gram négatif. La couche S est une structure multiprotéique présente à la surface de la bactérie. Elle agit comme une barrière physique pour la bactérie contre les parasites et les enzymes lytiques. Chez *Caulobacter*, la couche S est constituée d'une protéine de 98 kDa, RsaA (Awram and Smit 1998). La couche S joue également un rôle important dans la transduction par des phages ϕ CR30. Ceux-ci sont un outil important dans l'analyse génétique chez *C. crescentus*. Leur avantage par rapport à d'autres techniques comme la conjugaison ou l'électroporation est qu'ils permettent l'introduction de segments d'ADN plus grands. Afin d'insérer le fragment d'ADN, le phage doit d'abord entrer en contact avec la bactérie. Suite à des expériences avec des mutants déficients pour la protéine RsaA, on a pu démontrer que c'est la couche S à la surface de la bactérie qui sert de récepteur au phage (Edwards and Smit 1991).

De plus, *Caulobacter crescentus* présente des homologues avec d'autres espèces bactériennes pour le système de sécrétion de type II. Celui-ci permet l'exportation d'une protéine de fonction inconnue (Sophie Leblastier, thèse en cours). Cette bactérie possède également des homologues avec le système de sécrétion de type IV qui est surtout répandu chez des bactéries pathogènes.

Objectifs du mémoire

Le système de sécrétion de type IV est un système ubiquitaire que l'on retrouve parmi un grand nombre de bactéries à Gram négatif. Il intervient dans la symbiose ainsi que dans la virulence de plusieurs espèces pathogènes telles que *Agrobacterium tumefaciens*, *Brucella* spp, *Helicobacter pylori* ou encore *Legionella pneumophila*. La localisation de ce système a également été étudiée chez certaines bactéries et semble dépendante de sa fonction. En effet, chez *A. tumefaciens*, le système de sécrétion de type IV se localise au pôle cellulaire où se produit le contact entre la bactérie et la cellule hôte tandis que chez *L. pneumophila*, la présence de la voie de type IV à la surface de la bactérie dépend de son cycle intracellulaire (Watarai, Andrews et al. 2001; Judd, Kumar et al. 2005). Afin de permettre l'élaboration de la voie de type IV à un moment ou un endroit précis, ces localisations doivent être dépendantes de partenaires structuraux et de régulation. Cependant, les bactéries pathogènes ne sont pas facilement manipulables en laboratoire, c'est pourquoi nous utilisons *Caulobacter crescentus* comme modèle.

C. crescentus fait partie des alphaprotéobactéries comme *A. tumefaciens* et *Brucella* spp. Cette bactérie dont le génome a été entièrement séquencé est couramment utilisée comme modèle pour des études sur le cycle cellulaire et la morphogenèse. Chez *C. crescentus*, un grand nombre de protéines de régulation possèdent une localisation particulière nécessaire à leur fonction. Celle-ci dépend en général du cycle cellulaire de la bactérie qui est composé d'une cellule flagellée ne pouvant se répliquer et d'une cellule pédonculée pouvant entamer la réplication de son chromosome. Par exemple, DivJ, une histidine kinase, se localise au pôle pédonculé de la bactérie où elle phosphoryle un régulateur de réponse, DivK, afin de la rendre bipolaire (Lam, Matroule et al. 2003). Suite à une étude bioinformatique, nous avons mis en évidence un homologue de l'opéron *virB* encodant le système de sécrétion de type IV chez *C. crescentus* lui permettant d'être utilisé comme modèle pour étudier les partenaires structuraux et régulateurs du système de sécrétion de type IV. Dans ce but, un crible visuel devra être réalisé en se basant sur la localisation de certains composants de la voie de type IV.

Lors de ce mémoire, notre premier objectif était de localiser chez *C. crescentus* le système de sécrétion de type IV ce qui permettra par la suite de réaliser le crible visuel. Dans ce but, deux protéines, VirB6 et VirB4, ont été fusionnées à un fluorochrome. VirB4 est une ATPase insérée en membrane interne du côté cytoplasmique et elle a été fusionnée avec la GFP qui émet dans le vert. VirB6 est un composant du canal transmembranaire inséré en membrane interne et elle a été fusionnée avec la mcherry qui émet dans le rouge et est capable de se replier pour s'insérer en membrane.

Par ailleurs, la fonction du système de type IV chez *C. crescentus* est inconnue et il serait par conséquent intéressant de la caractériser. Notre second objectif était de créer un délétant pour l'opéron *virB* afin de permettre une étude sur les différences physiologiques et de sécrétion existant entre la souche sauvage et la souche délétée pour la voie de sécrétion de type IV.

Résultats

I. Le système de sécrétion de type IV chez *Caulobacter crescentus*

Caulobacter crescentus présente dans son génome de fortes homologies de séquence avec le système de sécrétion de type I, II, III et IV. Il est connu que le système de type I permet la translocation de la protéine RsaA intervenant dans la formation de la couche S à la surface de la bactérie. Une protéine de fonction inconnue sécrétée par la système de sécrétion de type II a également été mis en évidence (Sophie Leblastier, thèse en cours). Suite à des analyses bioinformatiques, un opéron homologue à l'opéron *virB* du système de sécrétion de type IV d'*Agrobacterium tumefaciens* a été mis en évidence.

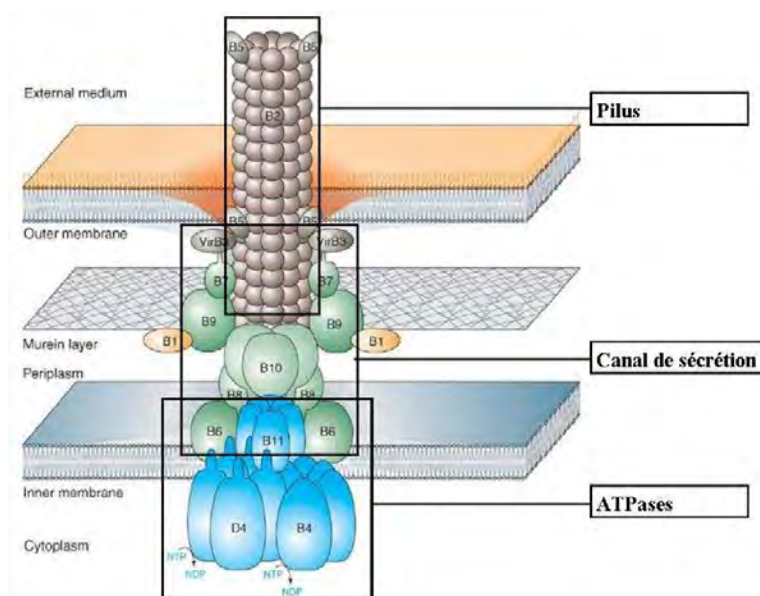


Figure 18 : Représentation du système de sécrétion de type IV (Backert and Meyer 2006).

Le système de sécrétion de type IV est composé de trois parties : les ATPases, le canal de sécrétion et le pilus (Fig.18). Les trois ATPases nommées VirB4, virB11 et VirD4 sont insérées en membrane interne du côté cytoplasmique. Elles interviennent dans l'assemblage de la voie de type IV à travers l'enveloppe bactérienne et fournissent l'énergie nécessaire à la translocation. La protéine VirD4 est principalement présente dans les systèmes intervenant dans la conjugaison. Ensuite, le canal de sécrétion traverse l'espace périplasmique en s'insérant dans la membrane interne et externe et est composé des protéines VirB3, B6, B7, B8, B9 et B10. Enfin, le pilus composé de VirB2 et VirB5 s'étend de la membrane externe à la surface de la cellule. L'assemblage du système de sécrétion de type IV est facilité par VirB1, une transglycosylase, qui va permettre la lyse de la couche de muréine située à la surface de la bactérie.

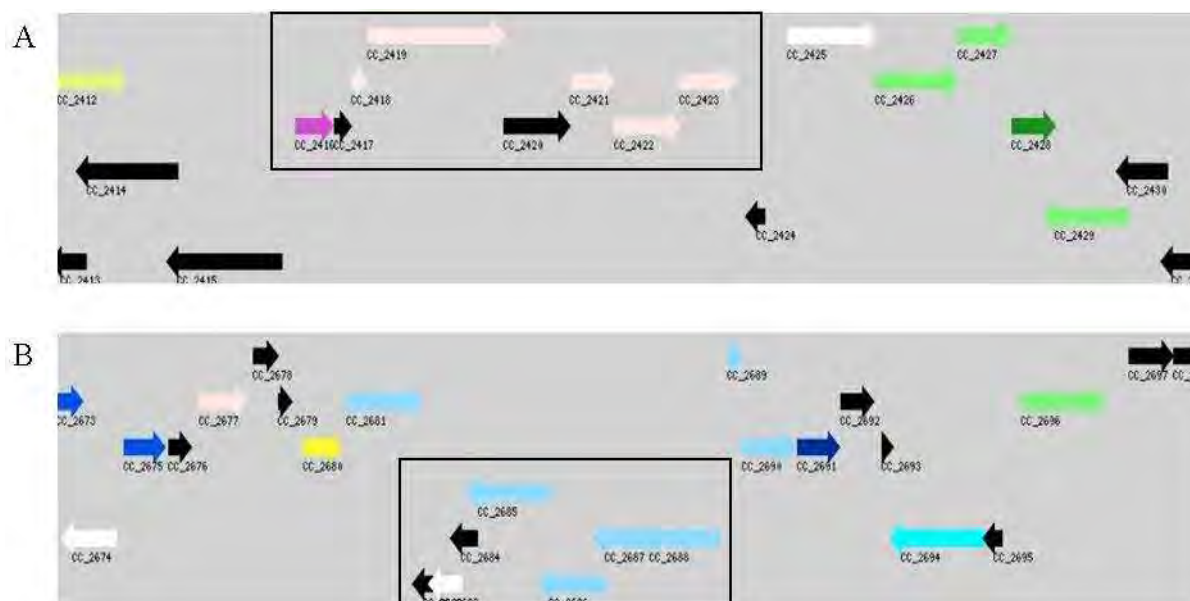


Figure 19 : (A) Représentation de l'opéron codant pour les composants du système de sécrétion de type IV chez *Caulobacter crescentus* (encadré en noir). (B) Représentation de l'opéron contenant les gènes homologues à *virB5*, *virB9* et *virB10* chez *Caulobacter crescentus* (encadré en noir).

L'opéron codant pour le système de sécrétion de type IV chez *C. crescentus* ne contient pas les 11 gènes *virB* ni le gène *VirD4* (Fig.19A). En effet, l'opéron ne contient que le gène *virB2* (CC_2417), *virB3* (CC_2418), *virB4* (CC_2419), *virB6* (CC_2420), *virB9* (CC_2421), *virB10* (CC_2422) et *virB11* (CC_2423). Trois gènes possédant des homologies avec *virB5* (CC_2687), *virB9* (CC_2686) et *virB10* (CC_2685) ont été identifiés au sein d'un autre opéron (Fig.19B). Les gènes *virB9* et *virB10* présents dans cet opéron sont homologues de ceux présents dans l'opéron de la voie de type IV. *C. crescentus* ne possède donc pas d'homologues des gènes *virB7* et *VirB8* dans son génome. La présence des 11 protéines VirB n'est pas nécessaire à la formation d'un système de sécrétion de type IV fonctionnel et cela a déjà été observé chez un certain nombre de bactéries telles que *Helicobacter pylori*. Ce pathogène ne possède pas les protéines VirB1, B2, B3, B5, B6 et B7 et a une voie de type IV active permettant la libération dans le cytosol de l'hôte de l'effecteur CagA.

Des alignements de séquences ont permis de mettre en évidence que les gènes des composants du système de sécrétion de type IV chez *C. crescentus* étaient homologues à ceux présents chez des alphaprotéobactéries, pathogènes ou non, ainsi que chez une espilonprotéobactérie pathogène, *H. pylori* (Tableau 1). Cette étude bioinformatique a également mis en évidence que les gènes *virB* de *C. crescentus* les plus conservés parmi ces espèces sont *virB4*, *B9*, *B10* et *B11*. Ces gènes codent pour deux ATPases (VirB4 et B11) et pour deux composants du canal de sécrétion (VirB9 et B10).

Alignement avec deux alphaprotéobactéries pathogènes

<i>Caulobacter crescentus</i> locus	Protéine hypothétique	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	E-value
CC_2417 (<i>virB2</i>)	Protéine B2 du T4SS	AvhB2	0,004
CC_2418 (<i>virB3</i>)	Protéine B3 du T4SS	AvhB3	1exp (-05)
CC_2419 (<i>virB4</i>)	Protéine B4 du T4SS	AvhB4	2exp (-153)
CC_2420 (<i>virB6</i>)	Protéine B6 du T4SS	AvhB6	1exp (-09)
CC_2421 (<i>virB9</i>)	Protéine B9 du T4SS	AvhB9	3exp (-23)
CC_2422 (<i>virB10</i>)	Protéine B10 du T4SS	AvhB10	4exp (-41)
CC_2423 (<i>virB11</i>)	Protéine B11 du T4SS	AvhB11	2exp (-60)

<i>Caulobacter crescentus</i> locus	Protéine hypothétique	<i>Rickettsia prowazekii</i>	E-value
CC_2417 (<i>virB2</i>)	Protéine B2 du T4SS	Pas d'homologies	
CC_2418 (<i>virB3</i>)	Protéine B3 du T4SS	Pas d'homologies	
CC_2419 (<i>virB4</i>)	Protéine B4 du T4SS	VirB4	2exp (-163)
CC_2420 (<i>virB6</i>)	Protéine B6 du T4SS	Pas d'homologies	
CC_2421 (<i>virB9</i>)	Protéine B9 du T4SS	VirB9	3exp (-15)
CC_2422 (<i>virB10</i>)	Protéine B10 du T4SS	VirB10	1exp (-23)
CC_2423 (<i>virB11</i>)	Protéine B11 du T4SS	VirB11	1exp (-74)

Alignement avec deux alphaprotéobactéries non-pathogènes

<i>Caulobacter crescentus</i> locus	Protéine hypothétique	<i>Erythrobacter litoralis</i>	E-value
CC_2417 (<i>virB2</i>)	Protéine B2 du T4SS	Pas d'homologies	
CC_2418 (<i>virB3</i>)	Protéine B3 du T4SS	VirB3	5exp (-25)
CC_2419 (<i>virB4</i>)	Protéine B4 du T4SS	VirB4	0,0
CC_2420 (<i>virB6</i>)	Protéine B6 du T4SS	Pas d'homologies	
CC_2421 (<i>virB9</i>)	Protéine B9 du T4SS	VirB9	3exp (-35)
CC_2422 (<i>virB10</i>)	Protéine B10 du T4SS	VirB10	8exp (-48)
CC_2423 (<i>virB11</i>)	Protéine B11 du T4SS	VirB11	5exp (-87)

<i>Caulobacter crescentus</i> locus	Protéine hypothétique	<i>Mesorhizobium loti</i>	E-value
CC_2417 (<i>virB2</i>)	Protéine B2 du T4SS	Pas d'homologies	
CC_2418 (<i>virB3</i>)	Protéine B3 du T4SS	Pas d'homologies	
CC_2419 (<i>virB4</i>)	Protéine B4 du T4SS	VirB4	1exp (-115)
CC_2420 (<i>virB6</i>)	Protéine B6 du T4SS	VirB6	1,8
CC_2421 (<i>virB9</i>)	Protéine B9 du T4SS	VirB9	9exp (-18)
CC_2422 (<i>virB10</i>)	Protéine B10 du T4SS	VirB10	2exp (-40)
CC_2423 (<i>virB11</i>)	Protéine B11 du T4SS	VirB11	5exp (-40)

Alignement avec une epsilonprotéobactérie pathogène

<i>Caulobacter crescentus</i> locus	Protéine hypothétique	<i>Helicobacter pylori</i>	E-value
CC_2417 (<i>virB2</i>)	Protéine B2 du T4SS	Pas d'homologies	
CC_2418 (<i>virB3</i>)	Protéine B3 du T4SS	Pas d'homologies	
CC_2419 (<i>virB4</i>)	Protéine B4 du T4SS	Cag23	2exp (-56)
CC_2420 (<i>virB6</i>)	Protéine B6 du T4SS	Pas d'homologies	
CC_2421 (<i>virB9</i>)	Protéine B9 du T4SS	Cag8	2exp (-05)
CC_2422 (<i>virB10</i>)	Protéine B10 du T4SS	Cag7	2exp (-23)
CC_2423 (<i>virB11</i>)	Protéine B11 du T4SS	TrbB	2exp (-35)

Tableau 1 : Tableaux illustrant les alignements de séquences réalisées entre *Caulobacter crescentus* CB15N, une epsilon- et des alphaprotéobactéries, pathogènes ou non, pour les composants du système de sécrétion de type IV.

En amont de l'opéron codant pour le système de sécrétion de type IV, la présence d'un gène (CC_2416) de fonction inconnue a été mise en évidence (Fig.19A). Une étude bioinformatique a montré des homologies entre CC_2416 de *C. crescentus* et différentes transglycosylases chez une epsilon- et des alpha-protéobactéries, pathogènes ou non (tableau 2). En effet, il est connu que, chez *Brucella melitensis*, VirB1 possède également une fonction de transglycosylase. De plus, une expérience de reverse transcriptase a montré que ce gène est exprimé en même temps que l'ensemble de l'opéron (Aurore Hamels, thèse en cours). Le gène CC_2416 pourrait donc coder pour une transglycosylase qui interviendrait dans l'établissement du système de type IV.

<i>Caulobacter crescentus</i> locus	CC_2416	Transglycosylase	E-value
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> locus	Atu2117	Transglycosylase	0,002
<i>Rickettsia prowazekii</i> locus	RP400	Transglycosylase	3exp (-12)
<i>Erythrobacter litoralis</i> locus	ELI_14615	Transglycosylase	2exp (-19)
<i>Mesorhizobium loti</i> locus	M117744	Transglycosylase	7exp (-10)
<i>Helicobacter pylori</i> locus	HP0645	Transglycosylase	9exp (-06)

Tableau 2 : Tableau illustrant les alignements de séquences réalisés entre le gène CC_2416 de *Caulobacter crescentus* et des gènes codant pour des transglycosylases chez une epsilon- et des des alphaprotéobactéries, pathogènes ou non.

Lors de ce mémoire, nous avons dans un premier temps localisé les protéines VirB6 et VirB4 chez *Caulobacter crescentus*. Le choix de ces protéines est dépendant de leur localisation au sein de l'enveloppe bactérienne. En effet, VirB6 est insérée dans la membrane interne et VirB4 est insérée en partie dans la membrane interne du côté cytoplasmique (Fig.18). La protéine de fusion utilisée pour visualiser ces protéines au microscope est la mcherry dans le cas de VirB6 et la GFP dans le cas de VirB4. L'avantage de la mcherry est qu'elle a la capacité de se replier afin de s'insérer en membrane. De plus, le choix de fusionner ces deux protéines avec deux protéines fluorescentes différentes permettra une étude de colocalisation par la suite. Dans un second temps, une souche délétée pour l'opéron *virB* a été créée.

II. Localisation de VirB6 sous le contrôle du promoteur du gène *lacZ*, *pLac*

La fusion de VirB6 avec la protéine fluorescente mcherry a été réalisée suivant la technique PCR expliquée à la figure 20. Dans un premier temps, les fragments A et B sont amplifiés séparément avec leurs primers respectifs. Les produits amplifiés sont purifiés et une troisième PCR est réalisée avec les primers externes (1 et 4) afin de synthétiser le fragment A-B. Le primer 1 contient un site de restriction *Bam*HI et le primer 4 un site de restriction *Eco*RI. Ceci permettra l'intégration du produit A-B amplifié et purifié dans son plasmide de destination lui-même restreint par ces enzymes.

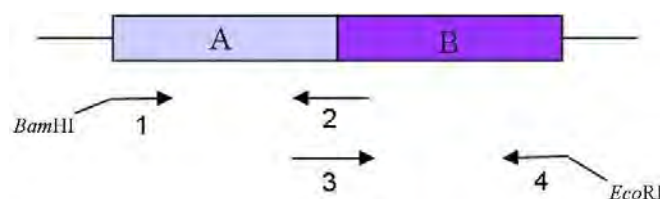


Figure 20 : Représentation de la méthode PCR utilisée pour la fusion des protéines avec leur protéine fluorescente. Deux premières PCR sont réalisées en parallèle afin d'amplifier séparément les fragments A et B. Les primers (1) et (2) sont utilisés pour l'amplification du fragment A et les primers (3) et (4) pour l'amplification du fragment B. Ensuite, une troisième PCR est réalisée avec les primers (1) et (4) afin d'amplifier le fragment A-B. De plus, le primer (1) possède un site de restriction *Bam*HI et le primer (4), un site de restriction *Eco*RI.

II.1. Construction de la fusion en position N-terminale de *virB6* insérée dans le plasmide pMR10

Deux premières PCR indépendantes ont permis l'amplification de *virB6* à une taille de 1160 pb (Fig.21A) et de *mcherry* à une taille de 700 pb (Fig.21B). Ces produits sont purifiés pour être ensuite ligués et amplifiés par PCR. De cette façon, nous obtenons un fragment de 1860 pb correspondant à *mcherry-virB6* et portant les sites de restrictions *Bam*HI et *Eco*RI (Fig.21C).

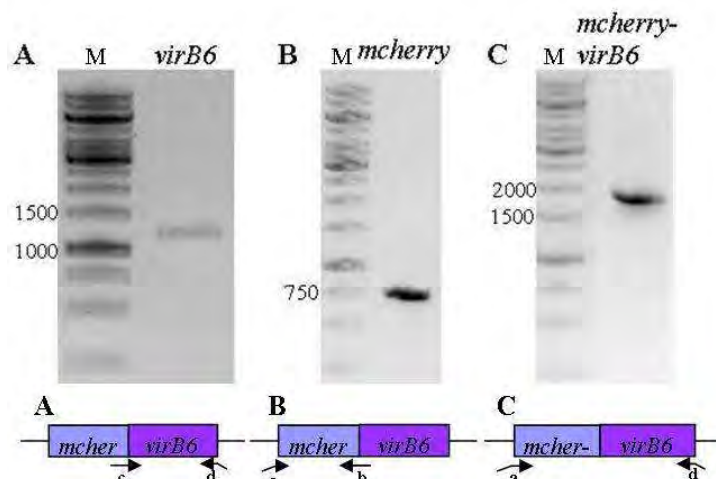


Figure 21 : Electrophorèse en gel d'agarose et détection au bromure d'éthidium du marqueur de poids moléculaire (puits de gauche), des produits PCR purifiés (puits de droite) et représentation des PCR réalisées (en dessous de chacune des micrographies). (A) Une bande est observée à 1160 pb correspondant à *virB6*. (B) Une bande est observée à 700 pb correspondant à *mcherry*. (C) Une bande est observée à 1860 pb correspondant à *mcherry-virB6*.

Après purification et restriction de ce produit PCR à la taille de 1860 bp, *mcherry-virB6* a été ligué dans le pMR10 restreint par *Bam*HI et *Eco*RI. Suite à la transformation dans des souches d'*Escherichia coli* DH10B, les clones ayant intégré le plasmide pMR10 et l'insert sont sélectionnés sur LB + Kan + X-Gal¹ + IPTG², le pMR10 possédant une cassette de résistance à la kanamycine. L'ADN plasmidique de ces clones est récupéré par minipréparation et une PCR diagnostique est réalisée avec les primers (a) et (d) afin de confirmer la présence de *mcherry-virB6* à une taille de 1860 pb (Fig.22). L'ADN plasmidique est également séquencé afin de confirmer l'absence de mutations.

¹ X-Gal (ou 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside) : dérivé de galactose qui peut être hydrolysé par la betagalactosidase en formant un composé bleu.

² IPTG (Isopropyl-beta-thio-galactoside) : inducteur de l'opéron lactose.

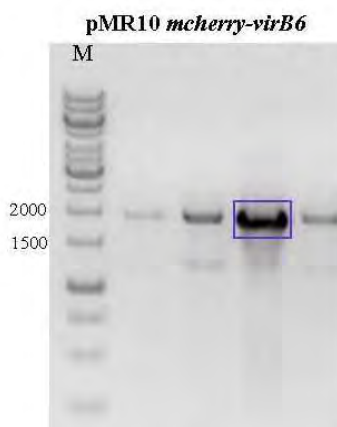


Figure 22 : Electrophorèse en gel d'agarose et détection au bromure d'éthidium du marqueur de poids moléculaire (puits de gauche) et des produits d'amplification après PCR diagnostique à partir du pMR10 *mcherry-virB6* (puits de droite). La bande encadrée en mauve est observée à 1160 pb correspondant à *mcherry-virB6*. Un des quatre clones choisis est positif.

II.2. Localisation de la fusion *mcherry-VirB6*

Le plasmide pMR10 contenant *mcherry-virB6* est récupéré par minipréparation et électroporé dans des souches de *C. crescentus* CB15N. Les clones ayant intégré le plasmide sont sélectionnés sur PYE + Kan et sont lancés en pré-culture dans du PYE toute une nuit à 30°C avant d'être mis en culture dans du milieu riche, le PYE, et dans du milieu pauvre, le M2G. Lorsque la DO^{660} atteint 0.8, 1 μ l de culture a été placé sur du M2G agar et visualisé au microscope à fluorescence. Les cellules contenant le plasmide de surexpression sont illuminées pendant 300 ms à la longueur d'onde appropriée (587 nm). Dans ces cellules, des foci fluorescents ont été observés (Fig.23). Parmi ces foci, 56% étaient visualisés au centre des cellules flagellées et pédonculées (Fig.23 flèche rouge) et 44% près d'un des pôles (Fig.23 flèche blanche). Dans les cellules prédivisionnelles, deux foci fluorescents sont observés près du septum (Fig.23 flèche mauve). De plus, dans la plupart des cellules, plusieurs protéines VirB6 fusionnées avec mcherry sont distribuées à travers l'ensemble de la cellule y compris dans le pédoncule (Fig.23 flèche bleue).

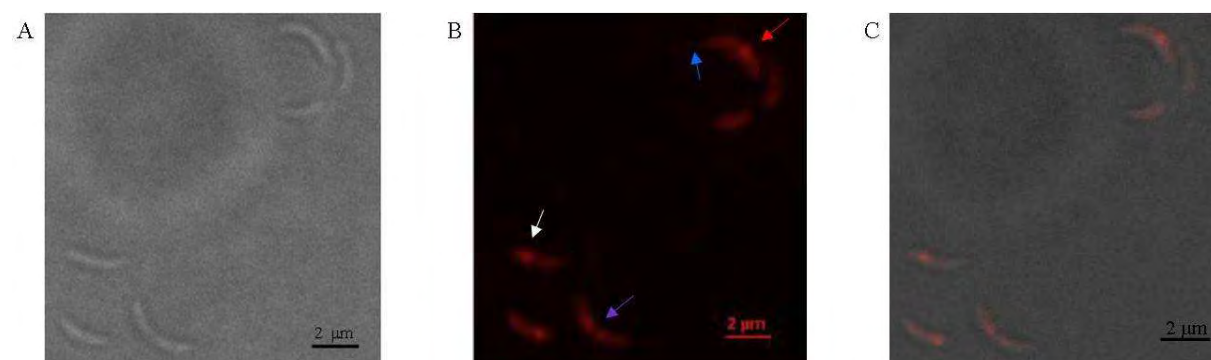


Figure 23 : Localisation de mcherry-VirB6 dans des souches de *C. crescentus* CB15N contenant le pMR10 *mcherry-virB6*. (A) Micrographie en DIC des souches de *C. crescentus* CB15N contenant le pMR10 *mcherry-virB6*. (B) Micrographie à fluorescence en TxRed des souches de *C. crescentus* CB15N contenant le pMR10 *mcherry-virB6*. La flèche blanche montre un focus fluorescent près du pôle cellulaire, la flèche rouge montre un focus situé au centre de la cellule, la flèche mauve montre deux foci fluorescents situés près du septum dans une cellule prédivisionnelle et la flèche bleue montre le pédoncule fluorescent. (C) Superposition des deux premières photographies.

Une fusion de *virB6* en position C-terminale avec *mcherry* a également été réalisée. En effet, chez *Agrobacterium tumefaciens*, la séquence signal de VirB6 permettant son insertion en membrane est située du côté C-terminal mais sa localisation chez *C. crescentus* est inconnue. La technique de fusion est identique à celle utilisée pour *mcherry-virB6* (Fig.20). Cependant, le séquençage a mis en évidence la présence de trois mutations dont une dans la séquence de *virB6* (I560T) et deux dans la séquence de *mcherry* (K1166T et V1484A). Lors de l'observation au microscope à fluorescence, aucun foci n'a donc été observé.

III. Localisation de *mcherry-VirB6* sous le contrôle de son propre promoteur

L'intégration au locus de la fusion *mcherry-virB6* nécessite la construction d'un plasmide intégratif contenant en plus d'une cassette de résistance à la kanamycine et d'un marqueur de contre-sélection, notre région d'intérêt (Fig.27). Celui-ci est constitué de la région amont de *virB6* et en aval de celle-ci de notre fusion *mcherry-virB6*. L'intégration du plasmide suite à une première recombinaison sera sélectionnée sur kanamycine. Les clones sont alors mis en culture dans du PYE sans antibiotique afin d'enlever toute pression de sélection et de permettre la seconde recombinaison qui s'effectuera entre les gènes dupliqués sur l'ADN génomique. Les clones ayant subi la seconde recombinaison, et qui ont donc excisé le plasmide contenant *SacB*, sont sélectionnés sur sucrose. Un cribble PCR est alors effectué sur différents clones afin de détecter la présence de *mcherry-virB6*.

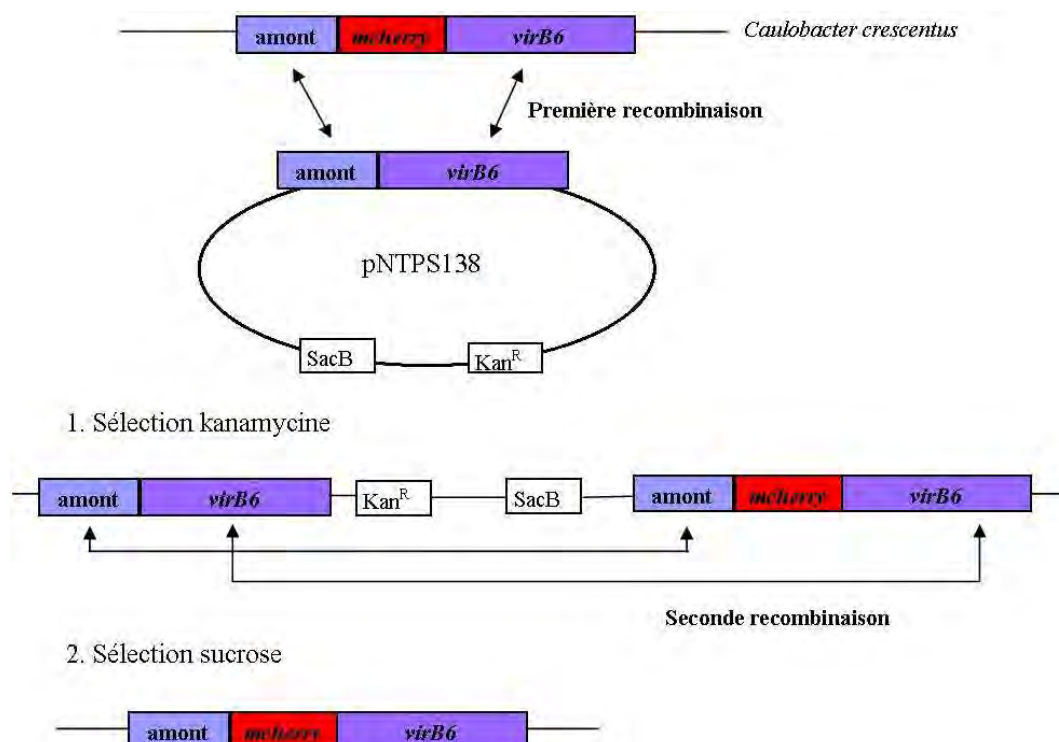


Figure 27 : Représentation schématique de la stratégie utilisée pour l'insertion de notre construction dans le génome de *Caulobacter crescentus* CB15N.

III.1. Construction de la fusion *mcherry-virB6* insérée dans le génome de *C. crescentus*

L'intégration dans le génome de *C. crescentus* de la fusion *mcherry-virB6* nécessite l'amplification de la région amont de *virB6* qui permettra le premier phénomène de recombinaison. Ainsi, après avoir amplifié la région amont de *virB6* (500 pb) et notre fusion *mcherry-virB6* (1860 pb), une troisième PCR a permis d'obtenir notre produit d'intérêt (2360 pb) (Fig. 28).

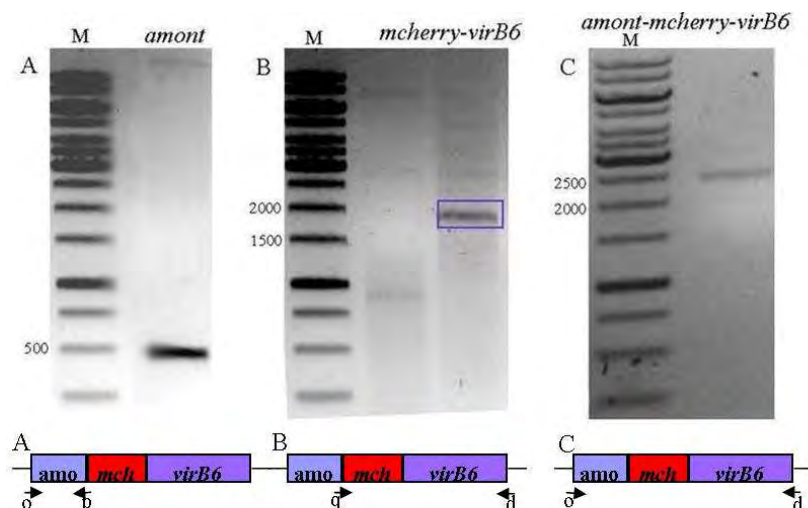


Figure 28 : Electrophorèse en gel d'agarose et détection au bromure d'éthidium du marqueur de poids moléculaire (puits de gauche), des produits PCR purifiés (puits de droite) et représentation des PCR réalisées (en dessous de chacune des micrographies). (A) Une bande est observée à 500 pb correspondant à la région amont de *virB6* dans le génome de *Caulobacter crescentus* CB15N. (B) Une bande encadrée en mauve est observée à 1860 pb correspondant à *mcherry-virB6*. (C) Une bande est observée à 2360 pb correspondant à *amont-mcherry-virB6*.

L'insert restreint par *Bam*HI et *Eco*RI est ensuite ligué dans le pNTPS138, un vecteur intégratif chez *C. crescentus*, lui-même restreint par ces enzymes. Les clones ayant intégrés pNTPS138 *amont-mcherry-virB6* sont d'abord sélectionnés sur LB + Kan + X-Gal + IPTG, le pNTPS138 contenant une cassette de résistance à la kanamycine. Afin de confirmer la présence de l'insert dans le plasmide, une restriction par *Bam*HI et *Eco*RI est effectuée sur l'ADN plasmidique récupéré par minipréparation (Fig.29).

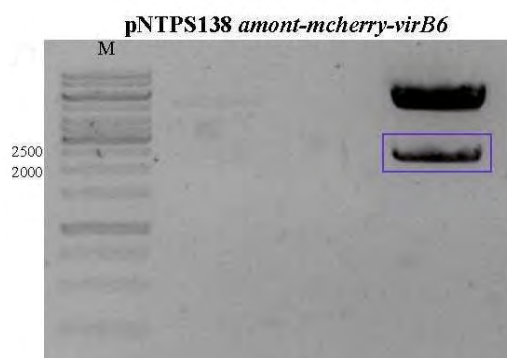


Figure 29 : Electrophorèse en gel d'agarose et détection au bromure d'éthidium du marqueur de poids moléculaire (puits de gauche) et des produits de la restriction de pNTPS138 *amont-mcherry-virB6* par *Bam*HI et *Eco*RI (puits de droite). Deux bandes sont observées, l'une à 6000 pb correspondant au pNTPS138 et l'autre encadrée en mauve à 2360 pb correspondant à *amont-mcherry-virB6*. Un des trois clones sélectionnés est positif.

Le plasmide pNTPS138 contenant *amont-mcherry-virB6* est électroporé dans des souches de *C. crescentus* CB15N. Les clones contenant le plasmide avec l'insert sont sélectionnés sur PYE + Kan. Les souches contenant *amont-mcherry-virB6* sont alors mises en culture dans du PYE sans antibiotique pendant toute une nuit à 30°C afin d'enlever toute pression de sélection et de permettre le second phénomène de recombinaison. Les clones ayant réalisés la seconde recombinaison sont alors sélectionnés sur PYE + sucrose. Une PCR diagnostique est réalisée afin d'amplifier une région de 2360 pb si CB15N a intégré *mcherry-virB6* dans son génome (Fig.30).

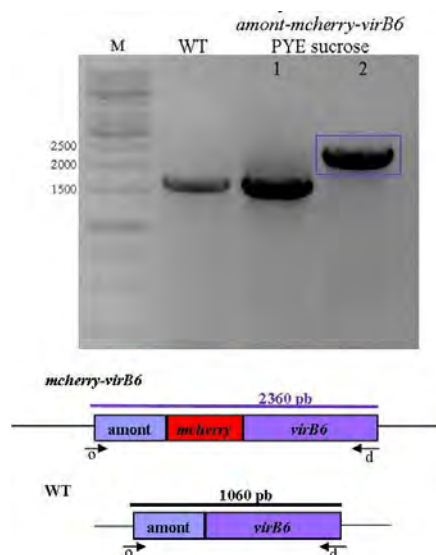


Figure 30 : Electrophorèse en gel d'agarose et détection au bromure d'éthidium du marqueur de poids moléculaire (puits de gauche), représentation de la PCR réalisée (en dessous de la micrographie) et des produits d'amplification après PCR diagnostique sur des clones sélectionnés sur PYE + sucrose (puits de droite). Une bande encadrée en mauve est observée à 2360 pb correspondant à *amont-mcherry-virB6* amplifié avec les amorces amont F et virB6 R. Dans les deux autres puits, des bandes sont observées à 1660 pb correspondant à la conformation sauvage *amont-virB6*.

III.2. Expression de mcherry-VirB6 chez *C. crescentus*

Les souches de *C. crescentus* CB15N ayant intégré *mcherry-virB6* ont été observés au microscope mais aucune fluorescence n'a été visualisée. Un *western blot* a alors été réalisé. L'extraction de protéines s'est produite dans différentes conditions telles que des milieux de culture différents (PYE, PYE1/5 et M2G) et à différentes DO^{660} (0.2, 0.4, 0.6, 0.8 et 1). Après révélation, aucune bande n'a été détectée excepté pour le contrôle positif. L'amplification par PCR dans *C. crescentus* de *amont-mcherry-virB6* a été séquencé et a mis en évidence l'insertion de deux codons stop dont un dans la région amont de *virB6* et l'autre dans la séquence de la *mcherry*.

IV. Localisation de GFP-VirB4 sous le contrôle du promoteur *pLac*

IV.1. Construction de la fusion en position N-terminale de *virB4* insérée sur le plasmide pMR10

Outre la localisation de VirB6, une autre protéine, VirB4, a été fusionnée avec la GFP. La technique utilisée pour la fusion de VirB4 en position N-terminale avec la GFP est identique à celle utilisée pour mcherry-VirB6 (Cfr.I.1.1.). Trois PCR ont donc été réalisées afin de synthétiser *gfp-virB4* à une taille de 3200 pb et d'y insérer les sites de restriction *Bam*HI et *Eco*RI (Fig.31).

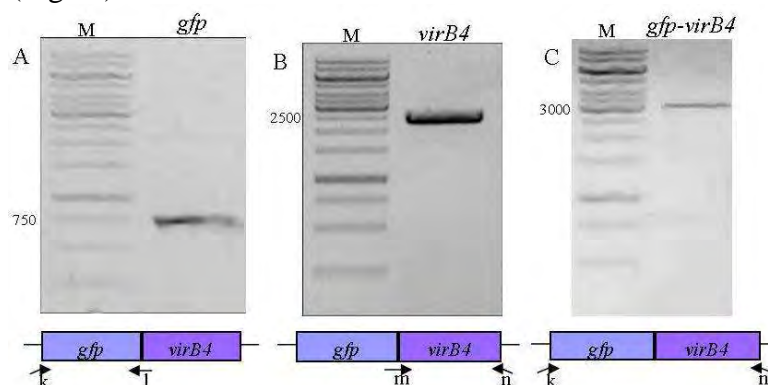


Figure 31 : Electrophorèse en gel d'agarose et détection au bromure d'éthidium du marqueur de poids moléculaire (puits de gauche), des produits PCR purifiés (puits de droite) et représentation des PCR réalisées (en dessous de chacune des micrographies). (A) Une bande est observée à 700 pb correspondant à *gfp*. (B) Une bande est observée à 2500 pb correspondant à *virB4*. (C) Une bande est observée à 3200 pb correspondant à *gfp-virB4*.

Le produit PCR *gfp-virB4* est purifié, restreint et ensuite ligué dans le pMR10 qui a également été digéré par *Bam*HI et *Eco*RI. Après transformation et sélection des clones contenant pMR10 *gfp-virB4*, une restriction diagnostique par *Bam*HI et *Eco*RI a permis de confirmer la présence de l'insert à une taille de 3200 bp (Fig.32). Un clone comportant l'insert est séquencé afin de confirmer l'absence de mutations. Les plasmides pMR10 contenant *gfp-virB4* sont alors électroporés dans des *C. crescentus* CB15N et les clones positifs sont sélectionnés sur PYE + Kan.

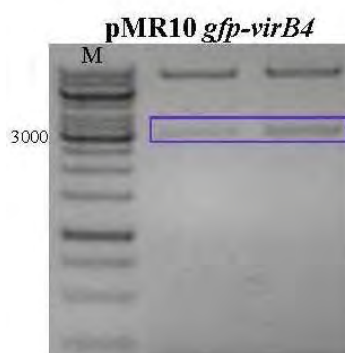


Figure 32 : Electrophorèse en gel d'agarose et détection au bromure d'éthidium du marqueur de poids moléculaire (puits de gauche) et des produits de la restriction de pMR10 *gfp-virB4* par *Bam*HI et *Eco*RI (puits de droite). Dans chaque puits, deux bandes sont observées, l'une à 8758 pb correspondant à pMR10 et l'autre encadrée en mauve à 3200 pb correspondant à *gfp-virB4*.

IV.2. Etude de l'expression de GFP-VirB4 chez *C. crescentus*

Un *western blot* a été effectué sur trois clones de CB15N contenant le plasmide d'intérêt afin de confirmer l'expression de GFP-VirB4. Ces clones ont été mis en culture dans du PYE et une extraction protéique a été réalisée après que les trois échantillons aient été concentrés à une DO^{660} de 2. L'utilisation d'un anticorps anti-GFP permet de visualiser la présence de la protéine fluorescente (27 kDa) fusionnée à VirB4 (91 kDa). Après révélation, une bande à 118 kDa est observée confirmant la présence de la GFP-VirB4 (Fig.33).

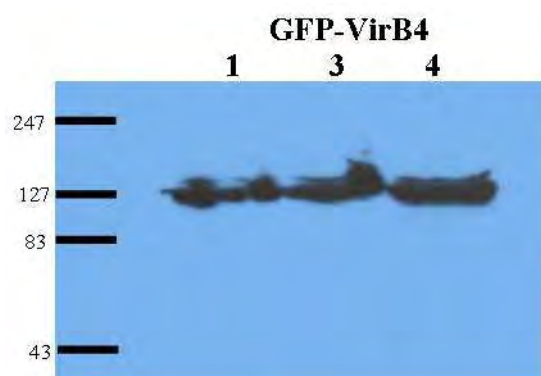


Figure 33 : *Western blot* de GFP-VirB4 dans *Caulobacter crescentus* CB15N concentré à une DO^{660} de 2. Le marqueur moléculaire se trouve dans le puits de gauche. Les trois autres puits correspondent à différents clones contenant les protéines GFP-VirB4 à 118 kDa.

IV.3. Localisation de la fusion GFP-VirB4

L'expression de la fusion GFP-VirB4 confirmée dans les souches de *C. crescentus* CB15N, celles-ci sont lancées en pré-culture dans du PYE. Le jour suivant, elles sont mises en culture dans du PYE, du M2G, et un milieu intermédiaire, PYE 1/5. Lorsqu'elles atteignent une DO^{660} de 0.5, 1 μ l de chacune des cultures est placé sur du M2G agar et visualisé au microscope à fluorescence (Fig.34). Dans chacune des conditions, des foci fluorescents sont observés. Dans certaines cellules, un ou deux foci fluorescents sont visualisés soit près des pôles de la cellule dans 30% des cas (Fig.34 flèches mauves) soit au centre dans 27% des cellules (Fig.34 flèches bleues). Dans 16% des cellules, plusieurs localisations sont observées sur tout le long de la cellule (Fig.34 flèches blanches). Dans les autres cellules, uniquement un bruit de fond vert est visualisé. Aucune différence n'a été observée entre les différents milieux de culture.

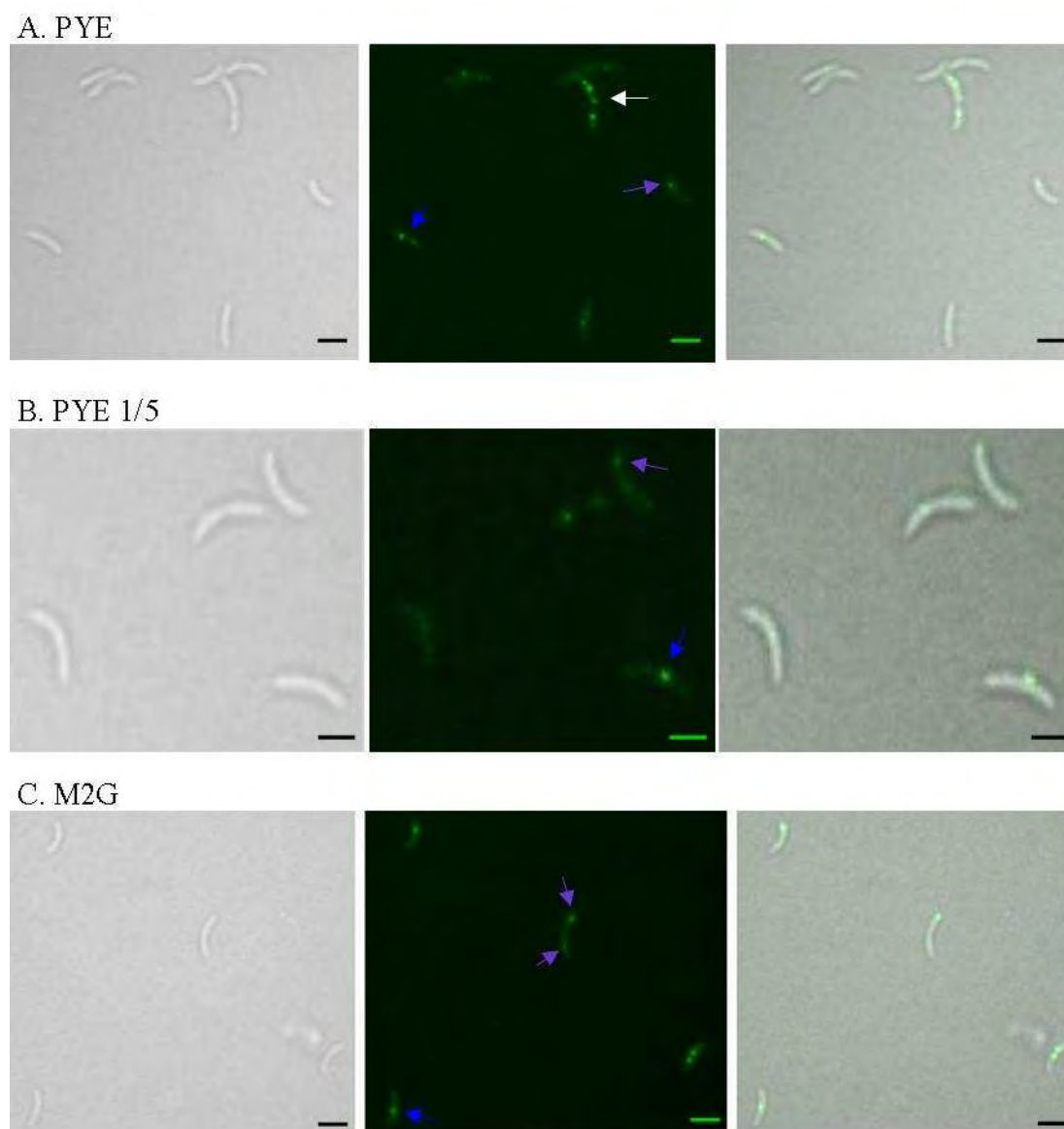


Figure 34 : Localisation de GFP-VirB4 dans des souches de *C. crescentus* CB15N contenant le pMR10 *gfp-virB4*. Micrographie en DIC de la souche de *Caulobacter crescentus* CB15N contenant pMR10 *gfp-virB4* dans la colonne de gauche, micrographie en GFP dans la colonne du milieu et superposition dans la colonne de droite. Dans certaines cellules, des foci fluorescents sont observés soit au pôle (flèches mauves) soit au centre (flèches bleues). Dans d'autres cellules, plusieurs foci sont observés indiqué par une flèche blanche. (A) Micrographies de souches de *Caulobacter crescentus* CB15N contenant pMR10 *gfp-virB4* mis en culture dans du PYE. (B) Micrographies de souches de CB15N contenant pMR10 *gfp-virB4* mis en culture dans du PYE 1/5. (C) Micrographies de souches de CB15N contenant pMR10 *gfp-virB4* mis en culture dans du M2G. La barre d'échelle représente 2 μ m.

V. Localisation de GFP-VirB4 sous le contrôle de son propre promoteur (en cours)

Afin de confirmer la localisation de GFP-VirB4, la fusion a été intégrée sous le contrôle de son propre promoteur dans le génome de *C. crescentus*. En effet, précédemment, *gfp-virB4* a été inséré sous le contrôle du *pLAC* et était donc surexprimé (Fig.34). La technique utilisée pour la création de la fusion *amont-gfp-virB4* est identique à celle réalisée

pour *amont-mcherry-virB6* (Cfr.III.1). Trois PCR ont donc permis de synthétiser et d'amplifier la fusion *amont-gfp-virB4* à une taille de 3700 pb (Fig.35).

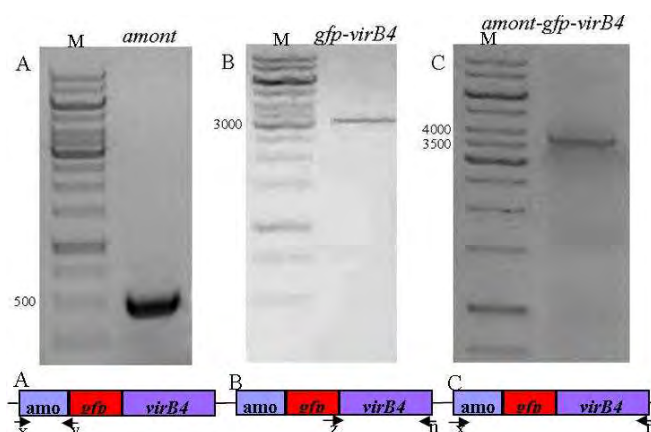


Figure 35 : Electrophorèse en gel d'agarose et détection au bromure d'éthidium du marqueur de poids moléculaire (puits de gauche), des produits PCR purifiés (puits de droite) et représentation des PCR réalisées (en dessous de chacune des micrographies). (A) Une bande est observée à 500 pb correspondant à la région *amont* de *virB4* dans le génome de *Caulobacter crescentus* CB15N. (B) Une bande encadrée en mauve est observée à 3200 pb correspondant à *gfp-virB4*. (C) Une bande est observée à 3700 pb correspondant à *amont-gfp-virB4*.

Le produit PCR *amont-gfp-virB4* est ensuite purifié, restreint et inséré dans le pNTPS138, restreint également par *Bam*HI et *Eco*RI. Après sélection des clones contenant le plasmide d'intérêt, une restriction diagnostique est réalisée afin de confirmer la présence de l'insert à 3700 pb (Fig.36). Le séquençage d'un clone a également permis de confirmer l'absence de mutations.

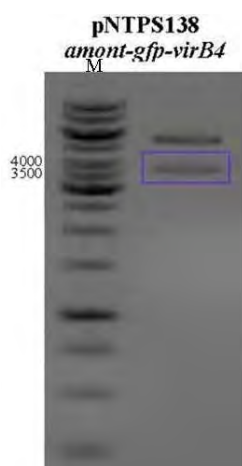


Figure 36 : Electrophorèse en gel d'agarose et détection au bromure d'éthidium du marqueur de poids moléculaire (puits de gauche) et des produits de la restriction de pNTPS138 *amont-gfp-virB4* par *Bam*HI et *Eco*RI (encadré en mauve). Deux bandes sont observées, l'une à 6000 pb correspondant au pNTPS138 et l'autre encadrée en mauve à 3700 pb correspondant à *amont-gfp-virB4*.

Le plasmide pNTPS138 contenant *amont-gfp-virB4* est ensuite électroporé dans des *C. crescentus* CB15N. Après sélection des clones contenant le plasmide sur PYE + Kan, ceux-ci sont mis en culture dans du PYE sans antibiotique afin d'enlever toute pression de sélection et de permettre l'excision du plasmide par recombinaison (Fig.27).

VI. Construction d'un délétant pour le système de sécrétion de type IV (en cours)

Afin de construire un délétant pour l'opéron encodant les composants du système de sécrétion de type IV, les régions amont et aval de l'opéron ont été amplifiées et insérées dans le pNTPS138. Grâce à ce plasmide intégratif et suite à deux recombinaisons (Fig.37), une souche délétée pour l'opéron de la voie de type IV sera construite chez *C. crescentus* CB15N.

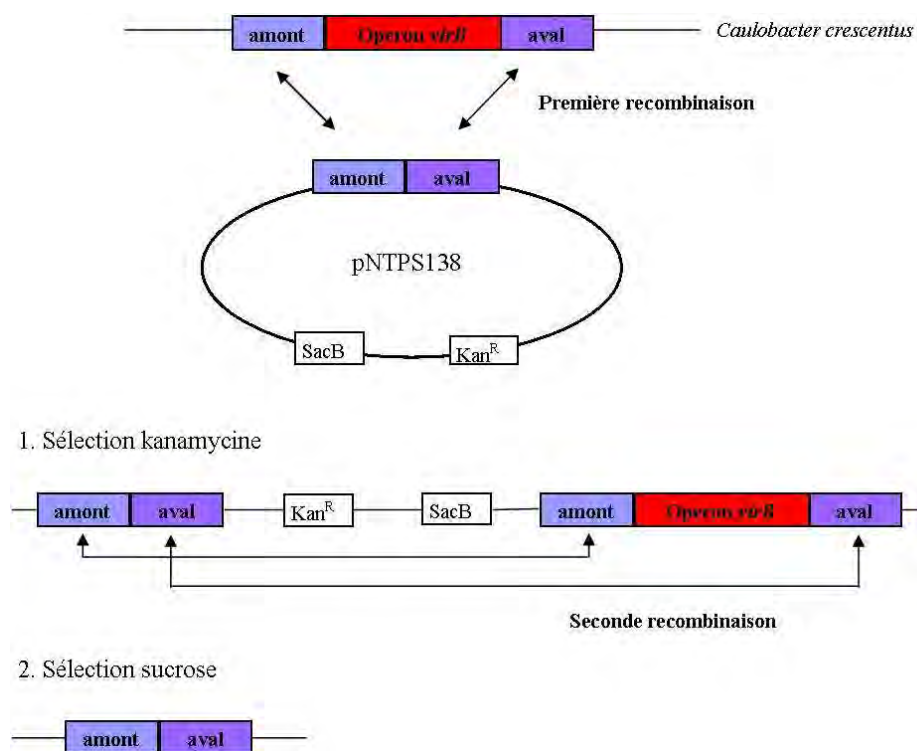


Figure 37 : Représentation schématique de la stratégie utilisée pour la délétion du système de sécrétion de type IV chez *C. crescentus*.

Tout d'abord, deux PCR réalisées en parallèle ont permis l'amplification d'une région de 1000 pb en amont et en aval de l'opéron et l'insertion de sites de restrictions *EcoRI* et *PstI* (Fig.38A et B). Les produits PCR sont alors digérés par *PstI* et *EcoRI* et ligués entre eux. Ensuite, le produit de ligation est inséré dans le pNTPS138, restreint par *EcoRI*. Après sélection des clones ayant intégrés le plasmide d'intérêt, une restriction diagnostique est réalisée (Fig.38C).

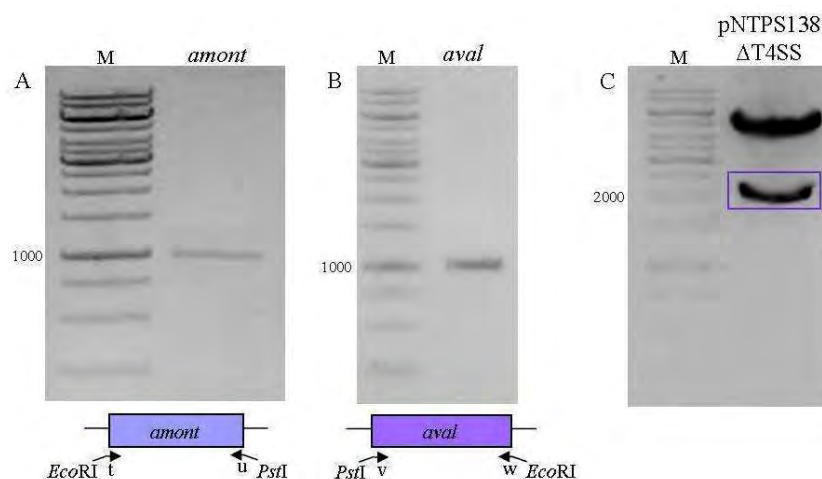


Figure 38 : Electrophorèse en gel d'agarose et détection au bromure d'éthidium du marqueur de poids moléculaire (puits de gauche), des produits PCR purifiés ou des produits de restriction (puits de droite) et représentation des PCR réalisées (en dessous des micrographies). (A) Produit d'amplification PCR. Une bande est observée à 1000 pb correspondant à la région amont de l'opéron T4SS. (B) Produit d'amplification PCR. Une bande est observée à 1000 pb correspondant à la région aval de l'opéron T4SS. (C) Produits de restriction de pNTPS138 contenant le produit de ligation de la région amont et avant de l'opéron T4SS. Deux bandes sont observées, l'une à 6000 pb correspondant au pNTPS138 et l'autre à 2000 pb correspondant au produit de ligation de la région amont et aval du T4SS.

Ensuite, le plasmide décrit ci-dessus est transformé chez *C. crescentus* CB15N. Après une double sélection sur Kan puis sur sucrose, une PCR diagnostique a été réalisée afin de confirmer l'absence de l'opéron codant pour les composants du système de sécrétion de type IV. Les primers utilisés s'hybrident à 200 pb en amont et en aval de la région délétée afin d'amplifier une région de 2400 pb confirmant l'absence de l'opéron (Fig.38).

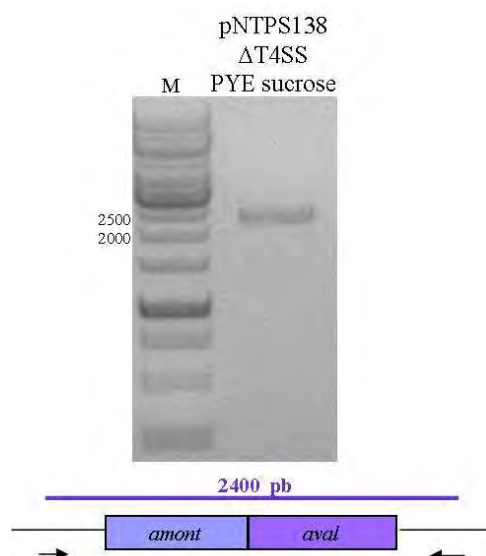


Figure 38 : Electrophorèse en gel d'agarose et détection au bromure d'éthidium du marqueur de poids moléculaire (puits de gauche), représentation de la PCR réalisée (en-dessous de la micrographie) et des produits d'amplification après PCR diagnostique sur des clones sélectionnés sur PYE + sucrose (puits de droite). Une bande encadrée en mauve, observée à 2400 pb, a été amplifiée avec les amorces check F et check R confirmant l'absence de l'opéron du système de sécrétion de type IV.

Discussions et perspectives

Au cours de l'évolution, les procaryotes ont acquis différents mécanismes afin de survivre et se répliquer dans un environnement extra- ou intra-cellulaire. Parmi ces mécanismes, les systèmes de sécrétion permettent le transport de protéines à travers l'enveloppe bactérienne. Ceux-ci leur permettent de s'adapter à l'environnement par la biogenèse d'appendices à leur surface ou encore la libération de facteurs de virulence chez les bactéries pathogènes. Parmi ceux-ci, le système de sécrétion de type IV permet la translocation de protéines ou de complexes ADN-protéine à travers les membranes bactériennes dépendamment ou indépendamment de la voie Sec en fonction du substrat sécrété (Lavigne, Botella et al. 2006). La voie de type IV est composée de 3 parties : (i) les ATPases qui fournissent l'énergie nécessaire à la translocation des protéines sécrétées, (ii) le canal de sécrétion qui forme un complexe à travers le périplasme en s'insérant dans la membrane interne et externe et (iii) le pilus qui s'étend à la surface de la bactérie (Christie, Atmakuri et al. 2005). Les fonctions du système de sécrétion de type IV sont (i) la conjugaison qui a principalement été étudiée chez *Agrobacterium tumefaciens*, (ii) la translocation d'effecteurs chez, par exemple, *Helicobacter pylori* et *Legionella pneumophila* et (iii) l'échange de matériel génétique avec le milieu extérieur permettant la transformation chez *Neisseria gonorrhoeae* (Lavigne, Botella et al. 2006). Le système de sécrétion de type IV est bien conservé parmi les bactéries à Gram négatif dont les alphaprotéobactéries pathogènes telles que *Agrobacterium tumefaciens*, *Brucella* spp, *Rickettsia prowazekii* et *Sinorhizobium loti* où il intervient dans leur virulence (Cao and Saier 2001).

Caulobacter crescentus appartient également au groupe des alphaprotéobactéries. Cette bactérie non-pathogène pour l'Homme est facilement manipulable en laboratoire et est privilégiée dans l'étude du cycle cellulaire et les mécanismes intervenant dans la différenciation cellulaire. En effet, *C. crescentus* est caractérisé par une division asymétrique formant deux cellules filles physiologiquement et morphologiquement distinctes (Goley, Iniesta et al. 2007). Suite à des études bioinformatiques, un homologue du système de sécrétion de type IV a été découvert chez *C. crescentus*. Celui-ci possède une fonction encore inconnue. Cependant, cette bactérie peut être utilisée afin de chercher des partenaires structuraux et des régulateurs de la voie de type IV qui pourront par la suite s'appliquer aux autres bactéries pathogènes possédant cette voie.

I. Caractérisation de l'opéron encodant le système de sécrétion de type IV chez *Caulobacter crescentus*

Le système de sécrétion de type IV est un système relativement bien conservé parmi les bactéries à Gram négatif. Cette voie est codée par un opéron composé de 11 gènes nommés *virB1-11* et en plus, dans le cas d'un système de conjugaison, du gène *virD4* localisé dans l'opéron *virD*. Suite à des études bioinformatiques, un opéron homologue contenant les gènes *virB2*, *B3*, *B4*, *B5*, *B6*, *B9*, *B10* et *B11* a été découvert chez *C. crescentus*. La présence de l'ensemble des composants de la voie de type IV n'est pas nécessaire à l'élaboration d'un système fonctionnel. Cela a déjà été observé chez des bactéries telles que *Helicobacter pylori*, *Rickettsia prowazekii* et *Bartonella pertussis*. L'opéron du T4SS chez *C. crescentus* contient une protéine supplémentaire, la CC_2416, possédant une fonction de transglycosylase. Celle-

ci posséderait la même fonction que la protéine VirB1 et interviendrait dans la lyse de la couche de muréine afin de faciliter l'élaboration du système de sécrétion de type IV.

II. Localisation de la protéine VirB6 chez *C. crescentus*

Avant d'effectuer un crible visuel permettant la reconnaissance de partenaires structuraux et de régulateurs du système de sécrétion de type IV, une localisation de cette voie a été réalisée chez *C. crescentus*. Deux protéines ont été localisées : VirB4, une protéine insérée en membrane interne du côté cytoplasmique, et VirB6, une protéine insérée dans la membrane interne.

VirB6 fait partie du canal de sécrétion qui forme un complexe à travers l'espace périplasmique en s'insérant dans les membranes interne et externe. Afin de ne pas entraver le repliement de cette protéine, elle a été fusionnée à la protéine fluorescente mcherry. De plus, une fusion en position C-terminale et N-terminale a été réalisée dans le but de fournir une indication sur la localisation de la séquence signal.

La fusion de VirB6 avec sa protéine fluorescente en position N-terminale et C-terminale a été insérée sous le contrôle du promoteur *pLAC* dans un plasmide réplcatif chez *C. crescentus*. Dans le cas de la fusion du côté N-terminal, des foci fluorescents ont été observés dans les différentes cellules. Cependant, nous ne pouvons pas considérer que le système de type IV possède une localisation particulière car, dans 56% des cellules, les foci se situaient au centre de la cellule et, dans les 44% restant près du pôle. De plus, dans les cellules prédivisionnelles, deux foci fluorescents étaient observés près du septum. En outre, dans les cellules où la mcherry a été fusionnée du côté C-terminal de VirB6, aucun foci n'a été observé.

Chez *Agrobacterium tumefaciens*, une étude de localisation de VirB6 fusionnée du côté C-terminale n'a donné aucune observation particulière et conduit à la conclusion que la séquence signal est située de ce côté (Judd, Kumar et al. 2005). Chez *C. crescentus*, dans le cas de la localisation de VirB6-mcherry, aucun foci n'a été observé également. Cette absence de localisation peut être due à la présence de la mutation dans la séquence de *virB6* empêchant un bon repliement de la protéine et son insertion en membrane ou à la présence de la séquence signal du côté C-terminal. Une nouvelle fusion non mutée devra donc être synthétisée et observée. Lorsque la mcherry a été fusionnée en position N-terminale de VirB6, des foci ont été observés. Ceux-ci ne possédaient pas de localisation particulière puisqu'ils étaient répartis à différents endroits dans les cellules. Cependant, nos observations ont été réalisées sur des cellules à un moment donné de leur cycle cellulaire. Afin d'étudier la localisation de VirB6 au cours de cycles de division, une synchronisation et un time-lapse devront être réalisés.

De plus, notre fusion étant insérée sous le contrôle du promoteur *pLAC*, notre protéine était surexprimée dans l'ensemble des cellules observées. L'observation de foci lors de la fusion en N-terminale peut alors être due à la présence d'agrégats de mcherry-VirB6 à cause de cette surexpression. C'est pourquoi, nos observations doivent être confirmées en réalisant un time-lapse et en plaçant la fusion *mcherry-virB6* sous le contrôle de son propre promoteur dans l'ADN génomique de *C. crescentus*. Cette construction est actuellement en cours d'élaboration.

III. Localisation de la protéine VirB4 chez *C. crescentus*

Un autre composant du système de sécrétion de type IV a également été localisé chez *C. crescentus* : VirB4. Cette protéine est une ATPase jouant un rôle dans l'assemblage du système et fournissant l'énergie nécessaire à la translocation de substrats (Middleton, Sjolander et al. 2005). VirB4 est insérée en membrane interne du côté cytoplasmique et a été fusionnée avec la protéine fluorescente GFP. Cette protéine a également été fusionnée en position N-terminale et C-terminale afin de fournir une information sur la localisation de la séquence signal de VirB4 chez *C. crescentus*.

Seule la fusion en position N-terminale a été observée au microscope à fluorescence. Dans ce cas, des foci fluorescents ont été observés dans 75% des cellules. Parmi 30% de celles-ci, un ou deux foci ont été visualisés au centre de la cellule. Dans 27% des cellules, un focus est visualisé à un des pôles ou deux foci sont localisés aux pôles opposés. Enfin 16% des foci sont localisés tout le long de la cellule. Comme cela était le cas pour la localisation de VirB6, nos cellules sont observées au microscope à un moment donné du cycle de division. Une synchronisation et un time lapse permettront d'étudier la localisation de VirB4 au cours du cycle cellulaire de *C. crescentus*.

De plus, notre fusion se trouve sous le contrôle du promoteur *pLAC* induisant une surexpression de la protéine. Afin de s'assurer que les foci visualisés ne sont pas le résultat d'une agrégation de GFP-VirB4, la fusion est insérée sous le contrôle de son propre promoteur. L'intégration de *gfp-virB4* dans l'ADN génomique de *C. crescentus* est en cours.

IV. Caractérisation d'un délétant pour l'opéron codant le système de sécrétion de type IV chez *C. crescentus*

Le système de sécrétion de type IV est connu pour intervenir dans la translocation d'effecteurs de virulence, la conjugaison et le transfert de matériel génétique (Backert and Meyer 2006). Cependant, sa fonction chez *C. crescentus* est inconnue. Une souche délétée pour l'opéron codant la voie de type IV est construite afin d'étudier des différences morphologiques et de sécrétion possibles entre les souches possédant le système de sécrétion de type IV et celles ne possédant pas cette voie. *C. crescentus* n'étant pas pathogène pour l'Homme et ne réalisant pas la conjugaison, la voie de type IV pourrait intervenir dans son mode de vie ou dans l'échange de matériel génétique avec le milieu extérieur par transformation.

Des études chez *A. tumefaciens* ont montré que l'assemblage du système de sécrétion de type IV est un événement coordonné. En effet, chez cette bactérie phytopathogène, suite à un contact direct avec la cellule hôte, le canal de sécrétion de type IV est élaboré au pôle de la bactérie. Les trois premières protéines à se localiser sont VirB8, B3 et D4. Par la suite, VirB6, B7, B9 et B10 se localisent dépendamment de VirB8 afin de former le canal de sécrétion. Enfin, VirB2 et B5, les composants du pilus, traversent la membrane interne par ce canal. Les ATPases, VirB4 et B11, aident à l'assemblage de la voie de type IV et sont donc présentes au pôle indépendamment du contact entre la bactérie et la cellule hôte (Judd, Kumar et al. 2005).

Cet assemblage particulier peut être dépendant de protéines régulatrices ou structurales. Cependant, l'étude de ces dernières est délicate chez les alphaprotéobactéries pathogènes qui ne sont pas facilement manipulables en laboratoire contrairement à *C. crescentus*.

Afin de chercher des partenaires structuraux et de régulations, un crible visuel sera réalisé chez *C. crescentus*. Tout d'abord, trois protéines du système de sécrétion de type IV seront localisées (VirB4, B6 et B10) au moyen d'une fusion avec une protéine fluorescente. Ces composants de la voie de type IV se situent soit au niveau de la membrane interne du côté cytoplasmique (VirB4), soit insérés dans la membrane interne (VirB6) soit dans le périplasme (VirB10). Lorsqu'une localisation particulière sera observée, des mutations seront insérées aléatoirement dans l'ADN génomique de ces souches à l'aide de minitransposons Tn5. En effet, ceux-ci présentent une faible spécificité d'insertion chez *C. crescentus* leur permettant d'être un bon outil de mutagenèse pour obtenir une variété de phénotypes mutants (Ely and Croft 1982). Un crible visuel sera alors effectué afin de rechercher des clones présentant une différence de localisation pour un des composants de la voie de type IV fusionné à un fluorochrome. Ces clones sont ensuite isolés et un séquençage sera effectué au moyen de primers s'hybridant au niveau du transposon afin de connaître les gènes mutés. Les protéines encodées par ces gènes seront ensuite étudiées afin de connaître leur fonction et leur implication dans le système de sécrétion de type IV chez *C. crescentus* et, par la suite, chez d'autres bactéries utilisant cette voie. Lors de ce mémoire, des études préliminaires de localisation ont été réalisées. Par la suite, ces observations devront être confirmées et VirB10, un autre composant, sera également fusionné à un fluorochrome avant la réalisation du crible visuel.

De plus, la fonction du système de sécrétion de type IV chez *C. crescentus* est inconnue. C'est pourquoi, une souche délétée pour l'opéron codant la voie de type IV a été réalisée lors de ce mémoire. Des études de comparaison de morphologie, de profils de sécrétion, de croissance et de mortalité cellulaire dans différentes conditions permettront de caractériser ce système de sécrétion chez *C. crescentus*.

Matériels et méthodes

A. Souches et plasmides

Souches

Souche	Caractéristiques	Référence
<i>Escherichia coli</i> DH10B	F- <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr</i> - <i>hsdRMS</i> - <i>mcrBC</i>) 80 <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> Δ <i>lacX74</i> <i>deoR</i> <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>araD139</i> Δ(<i>ara</i> , <i>leu</i>)7697 <i>galU</i> <i>galK</i> <i>l-rpsL</i> <i>nupG</i> .	GibcoBRL (Invitrogen)
<i>Escherichia coli</i> S17	λ <i>pir</i> [<i>recA</i> <i>thi</i> <i>pro</i> <i>hsdR</i> ⁻ M ⁺ RP4::2-Tc::Mu::Km Tn7 lysogenised with λ <i>pir</i> phage].	(Miller and Mekalanos, 1988)
<i>Caulobacter crescentus</i> CB15N		

Plasmides

Plasmide	Caractéristiques	Référence
pNTPS138	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Low copy</i> intégratif chez <i>C. crescentus</i> • Origine de répllication chez <i>E. coli</i> • Kan^R, <i>sacB</i> 	
pMR10	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Low copy</i> réplcatif chez <i>C. crescentus</i> • Possède le promoteur LacZ • Amp^R 	
CJW1180	pSK contenant le gène codant pour la GFP	
pGemT easy	<ul style="list-style-type: none"> • Extrémités T cohésives • Amp^R 	Proméga
pDONR201	Vecteur donneur Kan ^R du système Gateway TM .	Invitrogen

B. Milieux de cultures

Milieu de culture bactériens

- Milieu riche pour *Escherichia coli* : milieu Luria Bertani (LB)

Pour 1 litre d'eau désionisée	Milieu liquide	Milieu solide
Hydrolysate de caséine (peptone)	10 g	10 g
NaCl	5 g	5 g
Yeast extract	5 g	5 g
Agar	-	15 g

- **Milieu riche pour *Escherichia coli* : milieu 2YT**

Pour 1 litre d'eau désionisée	Milieu liquide	Milieu solide
Mix pour LB liquide	20 g	35 g
Hydrolysate de caséine (peptone)	6 g	6 g
Yeast extract	5 g	5 g
Agar	-	1 g

- **Milieu riche pour *Caulobacter crescentus* : milieu Peptone Yeast Extract (PYE)**

Pour 1 litre d'eau désionisée	Milieu liquide	Milieu solide
Bactopeptone	2 g	2 g
Yeast extract	1 g	1 g
MgSO ₄	1 mM	1 mM
CaCl ₂	0,5 mM	0,5 mM
Agar	-	15 g

- **Milieu pauvre pour *Caulobacter crescentus* : milieu Peptone Yeast Extract (PYE) appauvri 5 fois**

Pour 1 litre d'eau désionisée	Milieu liquide
PYE	200 ml
CaCl ₂	1 mM
MgSO ₄	1 mM
Glucose 0,2 %	100 ml

- **Milieu pauvre pour *Caulobacter crescentus* : milieu M2G**

Pour 1 litre d'eau désionisée	Milieu liquide
M2 10x	100 ml
Dextrose 40%	5 ml
FeSO ₄ 1mM	1 ml
MgSO ₄ 1M	1 ml
CaCl ₂ 1M	0,5 ml

M2 10x	Pour 1 litre d'eau désionisée	Milieu liquide
	Na ₂ HPO ₄	17,4 g
	KH ₂ PO ₄	10,6 g
	NH ₄ Cl	5 g

C. Tampons et solutions

- **Solutions d'antibiotiques**

Noms	Solutions de dissolution	Concentration stock	Concentration finale pour <i>E. coli</i>	Concentration finale pour <i>C. crescentus</i>
Amp	Eau	100 mg/ml	100 µg/ml	100 ng/ml
Kan	Eau	50 mg/ml	50 µg/ml	50 ng/ml

- **Tampons minipréparations**

Tampon S1	
RNAase A	100 µg/ml
Tris HCl pH 8	50 mM
EDTA	10 mM

Tampon S2	
NaOH	200 mM
SDS	1 %

Tampon S3	
Acétate de potassium pH 5,5	3 M

- **PBS 20x**

Pour 1 litre d'eau désionisée

K ₂ HPO ₄ 2 mM	4 g
Na ₂ HPO ₄ 10 mM	28,2 g
KCl 2,7 mM	4 g
NaCl 137 mM	160 g

- **PBS Tween 0,05%**

Pour 1 litre d'eau désionisée

PBS stock 20x	50 ml
Tween 20%	500µl
H ₂ O	950 ml

- **Solution de blocking (Western Blot)**

Pour 1 litre d'eau désionisée

PBS Tween 0,05%	1 l
Lait en poudre	50 g

- **Mix M2 20x**

Pour 1 litre d'eau désionisée

Na ₂ HPO ₄	17,4 g
KH ₂ PO ₄	10,6 g
NH ₄ Cl	10 g

- **Tampon de chargement protéique 5x**

Pour 30 ml

Glycérol 50%	10 ml
β-mercaptoéthanol 5%	5 ml
SDS 10%	2 g
Tris 1,5 M pH 6,8	13 ml
Bleu de bromophénol	0,0005 g

- **Tampon TE**

Tris HCl pH 8	10 mM
EDTA	1 mM

- **Tampon de transfert : Towbeen buffer (Western Blot)**

Pour 1 litre d'eau désionisée

Tris Base	48 mM
Glycine	39 mM
SDS	0,04 %
Méthanol	200 ml

- **Tampon SDS-PAGE**

Pour 1 litre d'eau désionisée

Tris Base	30,35 g
Glycine	144 g
SDS	10 g

- **Gel de concentration et de migration**

Running 10 %	Volume finale : 10 ml
H ₂ O	4,2 ml
38,5 % Acrylamide	3,1 ml
1,5 M Tris pH 8,8	2,5 ml
10% SDS	0,1 ml
10% APS	0,1 ml
TEMED	0,008 ml

Stacking	Volume finale : 3 ml
H ₂ O	1,8 ml
38,5 % Acrylamide	0,39 ml
1,5 M Tris pH 6,8	0,75 ml
10% SDS	0,03 ml
10% APS	0,03 ml
TEMED	0,003 ml

Méthodes

Techniques relatives à l'utilisation de l'ADN

A. Polymerase chain reaction

Cette technique est utilisée pour amplifier rapidement un fragment d'ADN d'intérêt. Les séquences qui bordent le fragment doivent être connues pour pouvoir concevoir des amorces oligonucléotidiques, appelées primers, qui leur sont complémentaires.

La matrice d'ADN à amplifier est dénaturée par chauffage à 95 °C en présence des oligonucléotides et de dNTP. Le mélange est ensuite soumis à une diminution de température qui permet l'hybridation spécifique des amorces sur la matrice. La séquence d'intérêt est alors amplifiée à partir des primers, de 5' en 3' pour le brin néosynthétisé, par une ADN polymérase thermosensible (la Taq DNA polymérase de Promega ou l'Expand High Fidelity de Roche ou la Phusion). Le cycle de dénaturation/hybridation/élongation est répété plus de 25 fois et permet de cette façon une amplification exponentielle.

- **Mix PCR**

Réactifs	Quantités
Tampon 5X _{Taq/Ph}	10 µl
Mélange dNTP	2 µl
Primer 1 (20 µM)	1 µl
Primer 2 (20 µM)	1 µl
Matrice (ADN)	~20 ng
GoTaq ou Phusion	0,5 µl
Eau	Compléter à 50 µl

- **Programme pour la GoTaq :**

1. Dénaturation de 10 minutes à 94 °C (PCR sur colonies)
2. 25 cycles d'amplification qui comprend plusieurs étapes :
 - a. 30 secondes à 94 °C pour dénaturer.
 - b. 30 secondes à X °C pour hybrider. $X = T_m - 10\text{ °C}$ ($T_m = 4(G+C) + 2(A+T)$).
 - c. Y minute(s) à 72 °C pour l'élongation. Y = taille du fragment à amplifier.
3. Elongation finale de 10 minutes à 72 °C.

- **Programme pour la Phusion :**

1. Dénaturation de 30 secondes à 98°C
2. 25 cycles d'amplification qui comprend plusieurs étapes :
 - a. 10 secondes à 98°C pour dénaturer
 - b. 30 secondes à X°C pour hybrider. $X = T_m \text{ le plus bas} + 3\text{°C}$.
 - c. Y minute(s) à 72 °C. Y = 30 secondes par kb.
3. Elongation finale de 10 minutes à 72 °C

Amorces		Sequences
<i>mcherry-virB6</i>	a	5'-agaggctgaaggtccatggtgagcaagggcgagga-3'
	b	5'-GGGCGGGGCAGACGTCTctgtacagctcgcc-3'
	c	5'-ggacgagctgtacaagGACGTCTGCCCCGCCC-3'
	d	5'-agaggctgaagaattcTCATCGGGACCCTCCGGTCA-3'
<i>virB6-mcherry</i>	e	5'-agaggctgaaggtaccGTGGACGTCTGCCCCGCCCC-3'
	f	5'-cctgccttgtctacTCGGGACCCTCCGGTC-3'
	g	5'-GACCGGAGGGTCCCCGAgtagcaagggcgagg-3'
	h	5'-Agaggctgaagaattctgtacagctcgcca-3'
<i>virB4 GW</i>	i	5'-agaggctgaaggtaccATGACCTCGCGCTTCCTCAG-3'
	j	5'-tggatccgatccatggtGCGATGCTCGCTCACGCT-3'
<i>GFP-virB4</i>	k	5'-agaggctgaaggtccatggtgagcaagggcgagga-3'
	l	5'-GAGGAAGCGCGAGGTctgtacagctcgcca-3'
	m	5'-tggacgagctgtacaagACCTCGCGCTTCCTC-3'
	n	5'-agaggctgaagaattcCTAGCGATGCTCGCTCACGC-3'
<i>Amont mcherry-virB6</i>	o	5'-attccggatcccaggcgctcgacggctcgattccggatcccaggcgctCGACGGTCG-3'
	p	5'- gcccttgtcacaccattagcgatgctcgctcgcccttgtcacaccattagcgatgctcgctc-3'
	q	5'-gagcgagcatcgctaattgtgagcaaggcgctgcgagcatcgctaattggtgagcaaggcg-3'
Check <i>virB6</i> F	r	5'- gccccgccgtcctcgcgcccgccgtcctcg-3'
Check <i>virB6</i> R	s	5'- gccgacggcgacgttctgccgacggcgacgttct-3'
Type IV Amont F (EcoRI)	t	5'- tacttgaattccccctgcgcgtcgagtacttgaatcgag-3'
Type IV Amont R (PstI)	u	5'- tcactgcaggactatcacgcgttcgt-3'
Type IV Aval F (PstI)	v	5'- ttactgcaggccgaactttcgattaag-3'
Type IV Aval R (EcoRI)	w	5'- tcaggaaatcgagagaagaagtctccgg-3'
<i>Amont GFP-virB4</i>	x	5'- cgggatccttcggggccctgctg-3'
	y	5'- ctctaccgcccatggtgagcaag-3'
	z	5'- ttgtcaccatggcggttagga-3'
Check <i>virB4</i> F	1	5'- cacggcgcggtcccc-3'
Check <i>virB4</i> R	2	5'- gtcacacccagcagc-3'

Le protocole suivi pour purifier des fragments d'ADN obtenus par reactions PCR est celui du kit MSB Spin PCRapace d'Invitex.

L'électrophorèse en gel d'agarose sépare les fragments d'ADN dans un champ électrique en fonction de leur taille. La taille des fragments est estimée à l'aide d'un marqueur d'ADN de tailles connues, l'HyperLadder de Bioline. La révélation d'ADN est réalisée grâce au bromure d'éthidium, composé fluorescent qui rend la double hélice visible sous UV, en s'intercalant entre ses bases. La fluorescence d'un fragment est proportionnelle à sa taille, ainsi qu'à la quantité d'ADN déposé, qui peut être calculée par comparaison des intensités de fluorescence des bandes du marqueur.

1. Dissoudre par chauffage 1 g d'agarose dans 100 ml de tampon TAE 1X.
2. Couler le gel dans un support adéquat muni de peignes.
3. Ajouter 5 µl de bromure d'éthidium.
4. Laisser polymériser et charger les échantillons et le marqueur moléculaire.

Bromure d'éthidium	Solution d'alourdisseur	Tampon TAE 50X
2 mg/ml d'eau	Glycérol 50 % EDTA 100 mM SDS 1 % Bleu de bromophénol ou méthyl orange	Tris HCl pH 8 40 mM EDTA 50 mM Acide acétique froid 57,1 ml/litre

D. Purification d'ADN sur gel

La purification d'ADN à partir du gel se fait à l'aide du kit QIAquick™ Gel extraction de Quiagen. Ce kit permet d'extraire et de purifier de l'ADN à partir d'un gel d'agarose standard.

1. Extraire le fragment d'intérêt à l'aide d'un scalpel et le peser.
2. Ajouter 3 volumes de *Binding solution* pour un volume de gel.
3. Incuber 5 minutes à 55 °C pour dissoudre l'agarose.
4. Ajouter 5 µl de *silica powder suspension* qui est au préalable vortexé pour remettre les billes de silices en suspension.
5. Incuber 5 minutes à 55 °C en vortexant toutes les 2 minutes.
6. Centrifuger pendant 5 minutes à 12000 rpm.
7. Retirer le surnageant et ajouter 500 µl de *wash buffer* froid.
8. Répéter l'opération 3 fois.
9. Après le dernier lavage, laisser 10 minutes à l'air.
10. Resuspendre le culot dans 20 µl d'eau stérile.
11. Incuber 5 minutes à 55 °C.
12. Centrifuger 2 minutes à 12000 rpm.
13. Récupérer le surnageant et le conserver à – 20 °C.

E. Minipréparation d'ADN plasmidique

Cette technique permet d'isoler et de purifier les plasmides présents chez les bactéries.

1. Centrifuger 5 minutes à 12500 rpm les cultures (~ 1,5 ml).
2. Eliminer le surnageant et ajouter 300 µl de solution S1.
3. Resuspendre et ajouter 300 µl de solution S2.
4. Retourner les eppendorfs et laisser 5 minutes à température ambiante.
5. Ajouter 300 µl de solution S3.
6. Retourner les eppendorfs et centrifuger 15 minutes à 12500 rpm.
7. Récupérer le surnageant et ajouter 700 µl d'isopropanol.
8. Centrifuger 15 minutes à 12500 rpm.
9. Enlever le surnageant et ajouter 300 µl d'éthanol 70 % froid.
10. Centrifuger 5 minutes à 12500 rpm.
11. Enlever le surnageant et laisser sécher le culot à 37 °C pendant 5 minutes.
12. Resuspendre le culot dans 30 µl d'eau.

Il existe également un kit, le kit Nucleospin® (Marcherey-Nagel).

F. Restriction de plasmides

Les enzymes de restriction permettent de cliver l'ADN double brin de manière spécifique.

- 2 µl de tampon en fonction des enzymes utilisés (A, B, L, M ou H).
- 1 µl d'enzymes de restriction.
- X µl de plasmide.
- Porter à un volume final de 10 µl avec de l'eau.
- Incuber 1 heure dans un bain-marie à 37 °C.
- Les enzymes de restriction et leur tampon proviennent de chez Roche.

G. Ligation d'un plasmide

Réaction réalisée pendant 2 heures à température ambiante sur paillasse.

- Vecteur et insert dans un rapport moléculaire 1/1 pour un clonage directionnel et 1/3 pour un non directionnel.
- 2 µl de tampon 5X T4 DNA ligase.
- 1 µl de T4 DNA ligase.
- Porter à volume final (10 µl) avec de l'eau.

H. Clonage GatewayTM

Le système de clonage GatewayTM est un système de recombinaison *in-vitro*. Cette technique utilise les propriétés de recombinaison homologue du bactériophage λ au niveau des sites spécifiques *att* afin de s'insérer dans le génome de *E. coli*. Une première étape permet une recombinaison directionnelle dite BP entre les sites *attB* insérés à l'extrémité du gène d'intérêt par PCR et les sites *attP* portés par le vecteur donneur. Une seconde recombinaison dite LR se produit entre le vecteur d'entrée synthétisé servant de matrice et un vecteur de destination portant les sites *attR*.

Réaction LR :

- 150 ng de pDONR201
- 150 ng de vecteur de destination
- 1 µl de LR clonase
- 2 µl de tampon 5x
- Porter à volume final (10 µl) avec de l'eau désionisée.

Techniques relatives à l'utilisation de protéines

Western Blot

Le western blot est une méthode qui permet de détecter une protéine donnée dans un échantillon grâce à des anticorps. Cette technique commence par la préparation des échantillons prélevés d'une culture cellulaire. Ces cellules sont lysées grâce à des tampons ayant une forte concentration en sels afin de libérer le contenu cellulaire. Les échantillons sont alors bouillies dans une solution tampon contenant du Tris, du β -mercaptoéthanol, du sodium dodecil sulfate (SDS) et du glycérol.

Les échantillons sont alors placés sur un gel d'électrophorèse afin de séparer les protéines en fonction de leur taille. Un marqueur est également ajouté sur le gel de polyacrylamide afin de déterminer le poids moléculaire de nos protéines.

Avant la détection par les anticorps, il est nécessaire de transférer les protéines sur une membrane ayant la propriété de lier les protéines de manière non spécifique. Cette migration des protéines du gel vers la membrane de nitrocellulose est possible grâce à un courant électrique. Une fois le transfert terminé, l'étape de blocage permet de bloquer les sites d'interaction de la membrane afin d'éviter une liaison non-spécifique entre la membrane et les anticorps.

La détection se fait en 2 étapes. D'abord, la membrane est mise en présence d'un anticorps primaires qui reconnaît une partie de la protéine d'intérêt. Après plusieurs lavages dans une solution de SDS, la membrane est mise en présence d'un anticorps secondaire qui possède un site de reconnaissance de l'anticorps primaire et une peroxydase. Celle-ci est utilisée en conjonction avec un agent luminescent émettra de la luminescence proportionnelle à la concentration de protéines.

Préparation des échantillons

- Mise en cultures des clones de *Caulobacter crescentus* la veille dans du PYE.
- Mesure des DO des cultures à 540 nm.
- Transfert des 5 ml de culture en falcon.
- Centrifugation 10' à 5000 rpm.
- Elimination du surnageant.
- Concentration des échantillons à une DO de 6 dans du PBS 1x.
- Prélever 20 μ l de chaque falcon et le mettre dans un eppendorf.
- Ajouter sous hotte 5 μ l de bleu de chargement.
- Percer le bouchon de l'échantillon avec une aiguille.
- Chauffer les eppendorfs 10' à 100°C.
- Placer tout de suite sur glace et spinner.

Chargement du gel

- Placer le gel dans la cuve sur le support.
- Remplir la cuve avec le tampon de migration SDS-PAGE 1x.
- Charger 5 μ l d'étalon.
- Charger 25 μ l des échantillons avec une seringue Hamilton dans les puits.
- Migration à 300V et 25mA pendant 1heure.

Démoulage du gel

- Vider la cuve et enlever les plaques du support.
- Démouler le gel et enlever le stacking gel et le front de migration.
- Mesurer le gel.
- Placer le gel dans du tampon Towbeen.

Transfert

- Placer 3 papiers de Whatman imbibés de Towbeen buffer.
- Placer le gel.
- Placer la membrane imbibée de Towbeen buffer.
- Placer à nouveau 3 papiers de Whatman imbibés de Towbeen buffer.
- Transférer à 13V et ((Lx1) x 3) mA, 50W pendant 1heure.

Révélation

- Saturer la membrane 1h sous agitation avec du PBS Tween 0,05% lait 5%.
- Faire 3 lavages de 5' avec du PBS Tween 0,05%.
- Incuber 1h avec l'anticorps primaire dilué dans du PBS Tween lait 1%.
- Récupérer la solution d'anticorps.
- Faire 3 lavages de 5' avec du PBS Tween 0,05%.
- Incuber 1h avec l'anticorps secondaire dilué dans du PBS Tween lait 1%.
- Faire 3 lavages de 5' avec du PBS Tween 0,05%.
- Préparer la solution de révélation ECL.
- Dans la chambre noire, découper un morceau de film.
- Placer la membrane dans une chemise plastique, y placer la solution de révélation et fermer la chemise.
- Mettre la chemise dans la cassette de révélation et placer le film dessus.
- Laisser révéler le temps nécessaire.
- Retirer le film et le placer dans la solution de révélation jusqu'à l'apparition de bandes.
- Tremper le film 1'' dans le fixateur et dans l'eau.
- Rincer à l'eau de ville et laisser sécher.

Techniques relatives à l'utilisation des bactéries

Transformation bactérienne par électroporation

La transformation bactérienne consiste à faire entrer de l'ADN exogène dans une bactérie.

1. Décongeler les cellules compétentes pour la transformation, gardées à - 80 °C, sur glace.
2. Mettre 10 µl de plasmides dans des cuvettes d'électroporation, gardées sur glace.
3. Ajouter 100 µl de cellules électrocompétentes.
4. Appliquer une pulsion de 2 kV, capacité de 25 µF.

5. Ajouter 1 ml de milieu de culture riche.
6. Transvaser le contenu de la cuvette dans un eppendorf.
7. Placer les cellules sous agitation pendant 1 heure à une température de croissance optimale.
8. Étaler sur un milieu sélectif.
9. Incuber 24 h ou 48 h à température optimale de croissance.

Techniques relatives à l'utilisation du microscope

- **Préparation des échantillons pour la microscopie**

Agarose PAD :

1. Préparer une solution de PBS 1 % et d'agarose 1 % dans une bouteille.
2. Chauffer au micro-onde afin de dissoudre l'agar.
3. Déposer ~ 1 ml du mélange sur une lame de microscopie et la recouvrir d'un autre.
4. Laisser sécher et détacher doucement les deux lames.
5. Déposer 5 µl de la culture à observer et recouvrir avec une lame couvre objet.

Bibliographie

- Abdallah, A. M., N. C. Gey van Pittius, et al. (2007). "Type VII secretion--mycobacteria show the way." Nat Rev Microbiol **5**(11): 883-91.
- Aldridge, P. and K. T. Hughes (2001). "How and when are substrates selected for type III secretion?" Trends Microbiol **9**(5): 209-14.
- Aldridge, P. and K. T. Hughes (2002). "Regulation of flagellar assembly." Curr Opin Microbiol **5**(2): 160-5.
- Awram, P. and J. Smit (1998). "The *Caulobacter crescentus* paracrystalline S-layer protein is secreted by an ABC transporter (type I) secretion apparatus." J Bacteriol **180**(12): 3062-9.
- Backert, S. and T. F. Meyer (2006). "Type IV secretion systems and their effectors in bacterial pathogenesis." Curr Opin Microbiol **9**(2): 207-17.
- Backert, S. and M. Selbach (2008). "Role of type IV secretion in *Helicobacter pylori* pathogenesis." Cell Microbiol **10**(8): 1573-81.
- Bacon, D. J., R. A. Alm, et al. (2000). "Involvement of a plasmid in virulence of *Campylobacter jejuni* 81-176." Infect Immun **68**(8): 4384-90.
- Berks, B. C., T. Palmer, et al. (2003). "The Tat protein translocation pathway and its role in microbial physiology." Adv Microb Physiol **47**: 187-254.
- Berks, B. C., T. Palmer, et al. (2005). "Protein targeting by the bacterial twin-arginine translocation (Tat) pathway." Curr Opin Microbiol **8**(2): 174-81.
- Berks, B. C., F. Sargent, et al. (2000). "The Tat protein export pathway." Mol Microbiol **35**(2): 260-74.
- Blocker, A. J., J. E. Deane, et al. (2008). "What's the point of the type III secretion system needle?" Proc Natl Acad Sci U S A **105**(18): 6507-13.
- Cao, T. B. and M. H. Saier, Jr. (2001). "Conjugal type IV macromolecular transfer systems of Gram-negative bacteria: organismal distribution, structural constraints and evolutionary conclusions." Microbiology **147**(Pt 12): 3201-14.
- Cascales, E. and P. J. Christie (2003). "The versatile bacterial type IV secretion systems." Nat Rev Microbiol **1**(2): 137-49.
- Celli, J. (2006). "Surviving inside a macrophage: the many ways of *Brucella*." Res Microbiol **157**(2): 93-8.
- Celli, J. and J. P. Gorvel (2004). "Organelle robbery: *Brucella* interactions with the endoplasmic reticulum." Curr Opin Microbiol **7**(1): 93-7.
- Christie, P. J., K. Atmakuri, et al. (2005). "Biogenesis, architecture, and function of bacterial type IV secretion systems." Annu Rev Microbiol **59**: 451-85.
- Cianciotto, N. P. (2005). "Type II secretion: a protein secretion system for all seasons." Trends Microbiol **13**(12): 581-8.
- Cornelis, G. R. (2006). "The type III secretion injectisome." Nat Rev Microbiol **4**(11): 811-25.
- Delepelaire, P. (2004). "Type I secretion in gram-negative bacteria." Biochim Biophys Acta **1694**(1-3): 149-61.
- Delrue, R. M., C. Deschamps, et al. (2005). "A quorum-sensing regulator controls expression of both the type IV secretion system and the flagellar apparatus of *Brucella melitensis*." Cell Microbiol **7**(8): 1151-61.
- Derre, I. and R. R. Isberg (2005). "LidA, a translocated substrate of the *Legionella pneumophila* type IV secretion system, interferes with the early secretory pathway." Infect Immun **73**(7): 4370-80.

- Dillard, J. P. and H. S. Seifert (2001). "A variable genetic island specific for *Neisseria gonorrhoeae* is involved in providing DNA for natural transformation and is found more often in disseminated infection isolates." Mol Microbiol **41**(1): 263-77.
- Ding, Z., K. Atmakuri, et al. (2003). "The outs and ins of bacterial type IV secretion substrates." Trends Microbiol **11**(11): 527-35.
- Economou, A. (1999). "Following the leader: bacterial protein export through the Sec pathway." Trends Microbiol **7**(8): 315-20.
- Edwards, P. and J. Smit (1991). "A transducing bacteriophage for *Caulobacter crescentus* uses the paracrystalline surface layer protein as a receptor." J Bacteriol **173**(17): 5568-72.
- Ely, B. and R. H. Croft (1982). "Transposon mutagenesis in *Caulobacter crescentus*." J Bacteriol **149**(2): 620-5.
- Emody, L., M. Kerenyi, et al. (2003). "Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli*." Int J Antimicrob Agents **22 Suppl 2**: 29-33.
- Filloux, A. (2004). "The underlying mechanisms of type II protein secretion." Biochim Biophys Acta **1694**(1-3): 163-79.
- Filloux, A., A. Hachani, et al. (2008). "The bacterial type VI secretion machine: yet another player for protein transport across membranes." Microbiology **154**(Pt 6): 1570-83.
- Fronzes, R., H. Remaut, et al. (2008). "Architectures and biogenesis of non-flagellar protein appendages in Gram-negative bacteria." EMBO J **27**(17): 2271-80.
- Gentschev, I., G. Dietrich, et al. (2002). "The *E. coli* alpha-hemolysin secretion system and its use in vaccine development." Trends Microbiol **10**(1): 39-45.
- Goley, E. D., A. A. Iniesta, et al. (2007). "Cell cycle regulation in *Caulobacter*: location, location, location." J Cell Sci **120**(Pt 20): 3501-7.
- Guo, M., S. Jin, et al. (2007). "Recruitment of conjugative DNA transfer substrate to *Agrobacterium* type IV secretion apparatus." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(50): 20019-24.
- Henderson, I. R., F. Navarro-Garcia, et al. (2004). "Type V protein secretion pathway: the autotransporter story." Microbiol Mol Biol Rev **68**(4): 692-744.
- Hofreuter, D., S. Odenbreit, et al. (2001). "Natural transformation competence in *Helicobacter pylori* is mediated by the basic components of a type IV secretion system." Mol Microbiol **41**(2): 379-91.
- Holland, I. B., L. Schmitt, et al. (2005). "Type I protein secretion in bacteria, the ABC-transporter dependent pathway (review)." Mol Membr Biol **22**(1-2): 29-39.
- Jakubowski, S. J., V. Krishnamoorthy, et al. (2004). "*Agrobacterium tumefaciens* VirB6 domains direct the ordered export of a DNA substrate through a type IV secretion System." J Mol Biol **341**(4): 961-77.
- Johnson, T. L., J. Abendroth, et al. (2006). "Type II secretion: from structure to function." FEMS Microbiol Lett **255**(2): 175-86.
- Jones, K. M., H. Kobayashi, et al. (2007). "How rhizobial symbionts invade plants: the *Sinorhizobium-Medicago* model." Nat Rev Microbiol **5**(8): 619-33.
- Journet, L., K. T. Hughes, et al. (2005). "Type III secretion: a secretory pathway serving both motility and virulence (review)." Mol Membr Biol **22**(1-2): 41-50.
- Judd, P. K., R. B. Kumar, et al. (2005). "Spatial location and requirements for the assembly of the *Agrobacterium tumefaciens* type IV secretion apparatus." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(32): 11498-503.
- Judd, P. K., R. B. Kumar, et al. (2005). "The type IV secretion apparatus protein VirB6 of *Agrobacterium tumefaciens* localizes to a cell pole." Mol Microbiol **55**(1): 115-24.
- Judd, P. K., D. Mahli, et al. (2005). "Molecular characterization of the *Agrobacterium tumefaciens* DNA transfer protein VirB6." Microbiology **151**(Pt 11): 3483-92.

- Kaiser, D. (2007). "Bacterial swarming: a re-examination of cell-movement patterns." Curr Biol **17**(14): R561-70.
- Lai, E. M. and C. I. Kado (1998). "Processed VirB2 is the major subunit of the promiscuous pilus of *Agrobacterium tumefaciens*." J Bacteriol **180**(10): 2711-7.
- Lam, H., J. Y. Matroule, et al. (2003). "The asymmetric spatial distribution of bacterial signal transduction proteins coordinates cell cycle events." Dev Cell **5**(1): 149-59.
- Lavigne, J. P., E. Botella, et al. (2006). "[Type IV secretion system and their effectors: an update]." Pathol Biol (Paris) **54**(5): 296-303.
- Middleton, R., K. Sjolander, et al. (2005). "Predicted hexameric structure of the *Agrobacterium* VirB4 C terminus suggests VirB4 acts as a docking site during type IV secretion." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(5): 1685-90.
- Minamino, T., K. Imada, et al. (2008). "Molecular motors of the bacterial flagella." Curr Opin Struct Biol.
- Mueller, C. A., P. Broz, et al. (2008). "The type III secretion system tip complex and translocon." Mol Microbiol **68**(5): 1085-95.
- Mushegian, A. R., K. J. Fullner, et al. (1996). "A family of lysozyme-like virulence factors in bacterial pathogens of plants and animals." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(14): 7321-6.
- Nierman, W. C., T. V. Feldblyum, et al. (2001). "Complete genome sequence of *Caulobacter crescentus*." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(7): 4136-41.
- O'Toole, G., H. B. Kaplan, et al. (2000). "Biofilm formation as microbial development." Annu Rev Microbiol **54**: 49-79.
- Pelacic, V. (2008). "Type IV pili: e pluribus unum?" Mol Microbiol **68**(4): 827-37.
- Pukatzki, S., A. T. Ma, et al. (2007). "Type VI secretion system translocates a phage tail spike-like protein into target cells where it cross-links actin." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(39): 15508-13.
- Rieder, G., W. Fischer, et al. (2005). "Interaction of *Helicobacter pylori* with host cells: function of secreted and translocated molecules." Curr Opin Microbiol **8**(1): 67-73.
- Rusch, S. L. and D. A. Kendall (2007). "Interactions that drive Sec-dependent bacterial protein transport." Biochemistry **46**(34): 9665-73.
- Schmidt-Eisenlohr, H., N. Domke, et al. (1999). "Vir proteins stabilize VirB5 and mediate its association with the T pilus of *Agrobacterium tumefaciens*." J Bacteriol **181**(24): 7485-92.
- Sheng, J. and V. Citovsky (1996). "Agrobacterium-plant cell DNA transport: have virulence proteins, will travel." Plant Cell **8**(10): 1699-710.
- Skerker, J. M. and M. T. Laub (2004). "Cell-cycle progression and the generation of asymmetry in *Caulobacter crescentus*." Nat Rev Microbiol **2**(4): 325-37.
- Stephenson, K. (2005). "Sec-dependent protein translocation across biological membranes: evolutionary conservation of an essential protein transport pathway (review)." Mol Membr Biol **22**(1-2): 17-28.
- Tanaka, J., T. Suzuki, et al. (2003). "Structural definition on the surface of *Helicobacter pylori* type IV secretion apparatus." Cell Microbiol **5**(6): 395-404.
- Verstraeten, N., K. Braeken, et al. (2008). "Living on a surface: swarming and biofilm formation." Trends Microbiol.
- Vogel, J. P., H. L. Andrews, et al. (1998). "Conjugative transfer by the virulence system of *Legionella pneumophila*." Science **279**(5352): 873-6.
- Vogel, J. P. and R. R. Isberg (1999). "Cell biology of *Legionella pneumophila*." Curr Opin Microbiol **2**(1): 30-4.
- Watarai, M., H. L. Andrews, et al. (2001). "Formation of a fibrous structure on the surface of *Legionella pneumophila* associated with exposure of DotH and DotO proteins after intracellular growth." Mol Microbiol **39**(2): 313-29.

- Wisseman, C. L., Jr., E. A. Edlinger, et al. (1976). "Infection cycle of *Rickettsia rickettsii* in chicken embryo and L-929 cells in culture." *Infect Immun* **14**(4): 1052-64.
- Zomorodipour, A. and S. G. Andersson (1999). "Obligate intracellular parasites: *Rickettsia prowazekii* and *Chlamydia trachomatis*." *FEBS Lett* **452**(1-2): 11-5.
- Zupan, J., T. R. Muth, et al. (2000). "The transfer of DNA from *agrobacterium tumefaciens* into plants: a feast of fundamental insights." *Plant J* **23**(1): 11-28.

Table des matières

INTRODUCTION.....	- 2 -
I. LA SECRETION CHEZ LES PROCARYOTES	- 2 -
I.1. Les structures à la surface bactérienne.....	- 3 -
I.2. Les biofilms et la colonisation bactérienne.....	- 3 -
I.3. La virulence bactérienne.....	- 4 -
II. LES SYSTEMES DE SECRETION BACTERIENS	- 4 -
II.1. Les systèmes de sécrétion Sec indépendants.....	- 5 -
II.1.1. Le système de sécrétion de type I.....	- 5 -
II.1.2. Le système de sécrétion de type III.....	- 5 -
II.2. Les systèmes de sécrétion Sec dépendants.....	- 6 -
II.2.1. La voie Sec.....	- 6 -
II.2.1.1. La reconnaissance du précurseur	- 6 -
II.2.1.2. L'exportation et la libération du substrat dans le périplasme.....	- 7 -
II.2.2. Le système de sécrétion de type II	- 8 -
II.3. Les autres systèmes de sécrétion.....	- 8 -
III. LE SYSTEME DE SECRETION DE TYPE IV	- 9 -
III.1. Structure du système de sécrétion de type IV.....	- 10 -
III.2. Les fonctions du système de sécrétion de type IV	- 10 -
III.2.1. La conjugaison.....	- 11 -
III.2.2. La translocation d'effecteurs	- 11 -
III.2.3. Echange de matériel génétique avec le milieu externe.....	- 11 -
III.3. La localisation du système de sécrétion de type IV.....	- 12 -
IV. CAULOBACTER CRESCENTUS.....	- 13 -
IV.1. La division asymétrique	- 13 -
IV.2. Les systèmes de sécrétion chez <i>Caulobacter crescentus</i>	- 14 -
OBJECTIFS DU MEMOIRE	- 15 -
RESULTATS.....	- 17 -
I. LE SYSTÈME DE SÉCRÉTION DE TYPE IV CHEZ <i>CAULOBACTER CRESCENTUS</i>	- 17 -
II. LOCALISATION DE VIRB6 SOUS LE CONTRÔLE DU PROMOTEUR DU GÈNE LACZ, pLAC	- 20 -
II.1. Construction de la fusion en position N-terminale de virB6 insérée dans le plasmide pMR10.....	- 21 -
II.2. Localisation de la fusion mcherry-VirB6.....	- 22 -
III. LOCALISATION DE MCHERRY-VIRB6 SOUS LE CONTRÔLE DE SON PROPRE PROMOTEUR	- 23 -
III.1. Construction de la fusion mcherry-virB6 insérée dans le génome de <i>C. crescentus</i>	- 24 -
III.2. Expression de mcherry-VirB6 chez <i>C. crescentus</i>	- 25 -
IV. LOCALISATION DE GFP-VIRB4 SOUS LE CONTRÔLE DU PROMOTEUR pLAC	- 26 -
IV.1. Construction de la fusion en position N-terminale de virB4 insérée sur le plasmide pMR10	- 26 -
IV.2. Etude de l'expression de GFP-VirB4 chez <i>C. crescentus</i>	- 27 -
IV.3. Localisation de la fusion GFP-VirB4	- 27 -
V. LOCALISATION DE GFP-VIRB4 SOUS LE CONTRÔLE DE SON PROPRE PROMOTEUR (EN COURS)	- 28 -
VI. CONSTRUCTION D'UN DÉLÉTANT POUR LE SYSTÈME DE SÉCRÉTION DE TYPE IV (EN COURS).....	- 30 -
DISCUSSIONS ET PERSPECTIVES.....	- 33 -
I. CARACTERISATION DE L'OPÉRON ENCODANT LE SYSTEME DE SECRETION DE TYPE IV CHEZ <i>CAULOBACTER CRESCENTUS</i>	- 33 -
II. LOCALISATION DE LA PROTEINE VIRB6 CHEZ <i>C. CRESCENTUS</i>	- 34 -
III. LOCALISATION DE LA PROTEINE VIRB4 CHEZ <i>C. CRESCENTUS</i>	- 35 -
IV. CARACTERISATION D'UN DELETANT POUR L'OPÉRON CODANT LE SYSTEME DE SECRETION DE TYPE IV CHEZ <i>C. CRESCENTUS</i>	- 35 -
MATERIELS ET METHODES	- 38 -
A. Souches et plasmides.....	- 38 -
B. Milieux de cultures.....	- 38 -
C. Tampons et solutions.....	- 39 -
TECHNIQUES RELATIVES A L'UTILISATION DE L'ADN	- 42 -

<i>A. Polymerase chain reaction</i>	- 42 -
<i>B. Purification sur colonne</i>	- 43 -
<i>C. Electrophorèse en gel d'agarose</i>	- 43 -
<i>D. Purification d'ADN sur gel</i>	- 44 -
<i>E. Minipréparation d'ADN plasmidique</i>	- 44 -
<i>F. Restriction de plasmides</i>	- 45 -
<i>G. Ligation d'un plasmide</i>	- 45 -
<i>H. Clonage GatewayTM</i>	- 45 -
TECHNIQUES RELATIVES A L'UTILISATION DE PROTEINES	- 46 -
<i>Western Blot</i>	- 46 -
TECHNIQUES RELATIVES A L'UTILISATION DES BACTERIES	- 47 -
<i>Transformation bactérienne par électroporation</i>	- 47 -
TECHNIQUES RELATIVES A L'UTILISATION DU MICROSCOPE.....	- 48 -
BIBLIOGRAPHIE	- 50 -

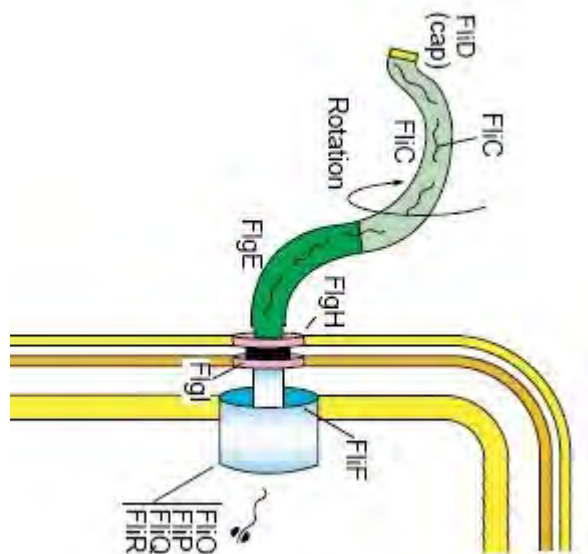


Figure 1 : Représentation schématique d'un flagelle. Celui-ci est constitué d'un corps basal, d'un coude et d'un filament. Le corps basal est inséré dans l'enveloppe bactérienne et permet la translocation des protéines flagellaires à l'extérieur de la bactérie. Le coude sert de jonction entre le corps basal et le filament. Le filament est un long appendice externe qui permet à la bactérie de se déplacer dans le milieu (Journet, Hughes et al. 2005).

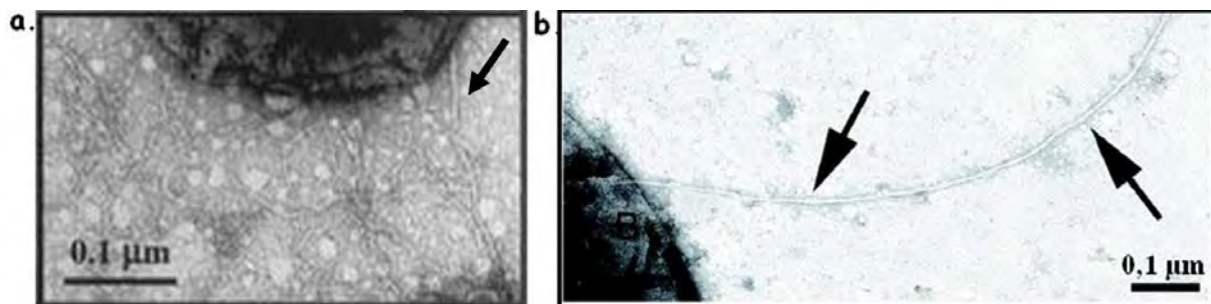


Figure 2 : Micrographie électronique de pili à la surface de *Geothermobacter ehrlichii* (a) et d'un pili de type IV chez *Haemophilus* spp. (b). (a) Micrographie électronique de *Geothermobacter ehrlichii* portant de longs filaments flexibles d'environ 2 à 3 nm de diamètre appelés pili ou fimbriae à sa surface (Kashefi, Holmes et al. 2003). (b) Micrographie électronique à transmission d'un long filament de 5 à 8 nm de diamètre appelé pili type IV chez *Haemophilus* spp (Juhas, Power et al. 2007).

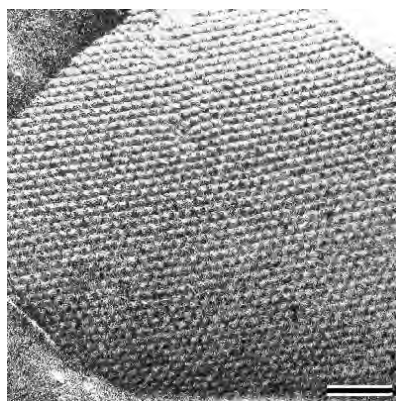
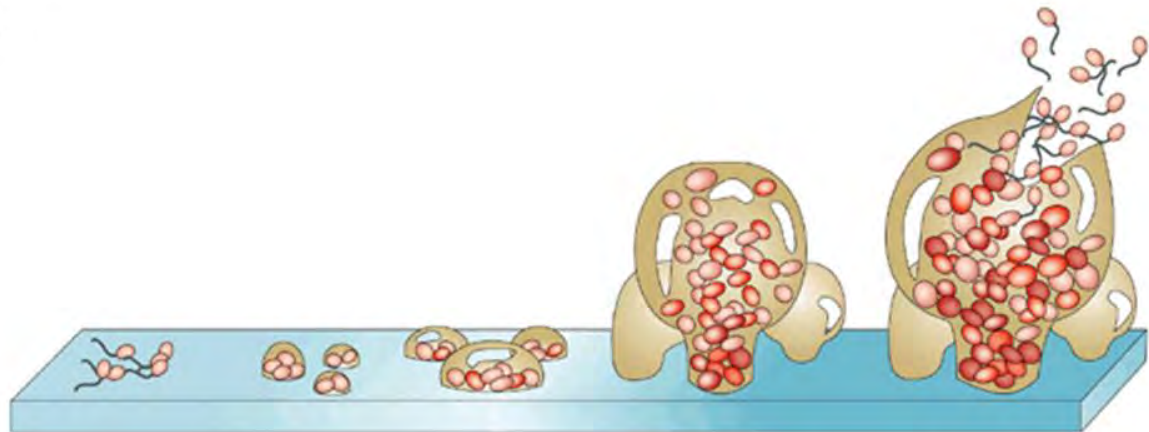
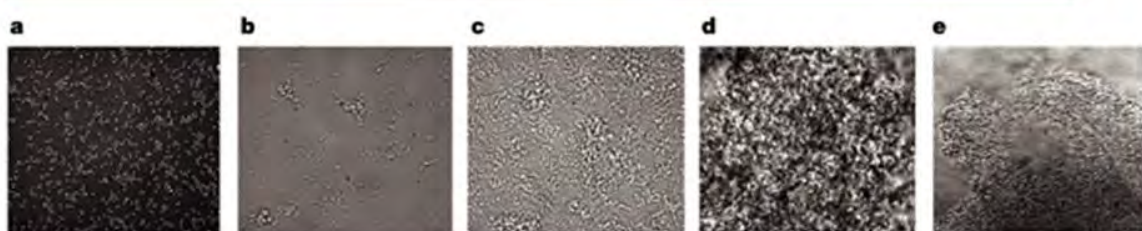


Figure 3 : Micrographie électronique à transmission d'une couche S à la surface d'une bactérie. (Dietmar Pum 1999)

A.



B.



Nature Reviews | Drug Discovery

Figure 4 : Formation d'un biofilm chez *Pseudomonas aeruginosa*. A. Schéma de la formation d'un biofilm. (a) Les premières cellules s'attachent à une surface afin de (b) former une monocouche. (c) D'autres cellules viennent s'attacher à la monocouche jusqu'à (d) la formation d'un biofilm mature. (e) Suite à des stimuli environnementaux comme, par exemple, un épuisement de la source en nutriments, les cellules se détachent du biofilm pour revenir à un mode de vie planctonique. B. Micrographies électroniques représentant la formation d'un biofilm par *Pseudomonas aeruginosa*. Toutes les micrographies sont à la même échelle (Davies 2003).

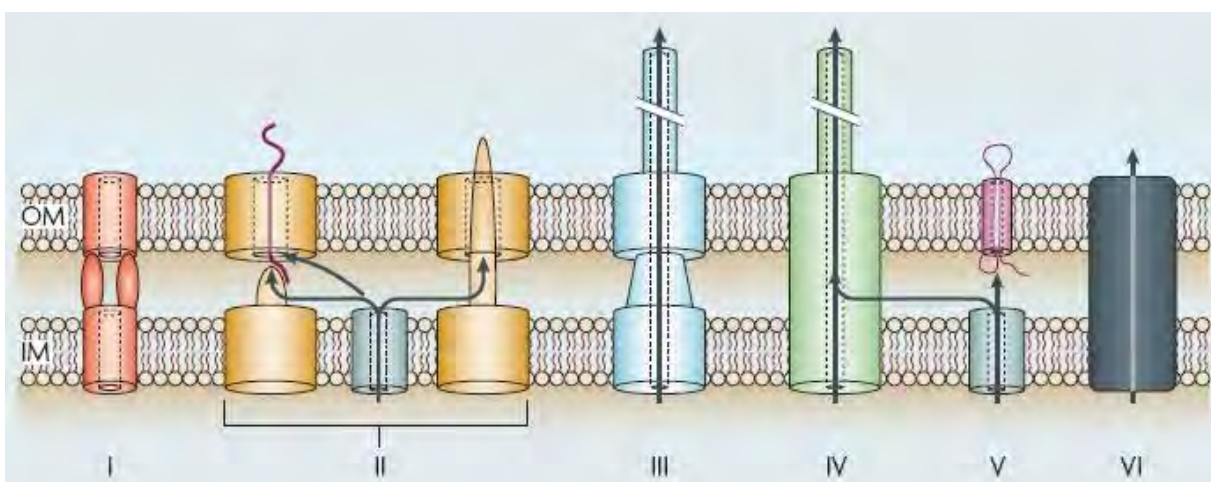


Figure 5 : Les systèmes de sécrétion de type I, II, III, IV, V et VI. Les systèmes de type I, III et VI exportent les substrats du cytoplasme à l'extérieur de la bactérie en une seule étape. Les systèmes de type II, IV et V sont des voies sécrétant les substrats en deux étapes. La protéine traverse la membrane interne via la voie Sec et ensuite la membrane externe via la voie de type II, IV ou V selon les substrats (Abdallah, Gey van Pittius et al. 2007).

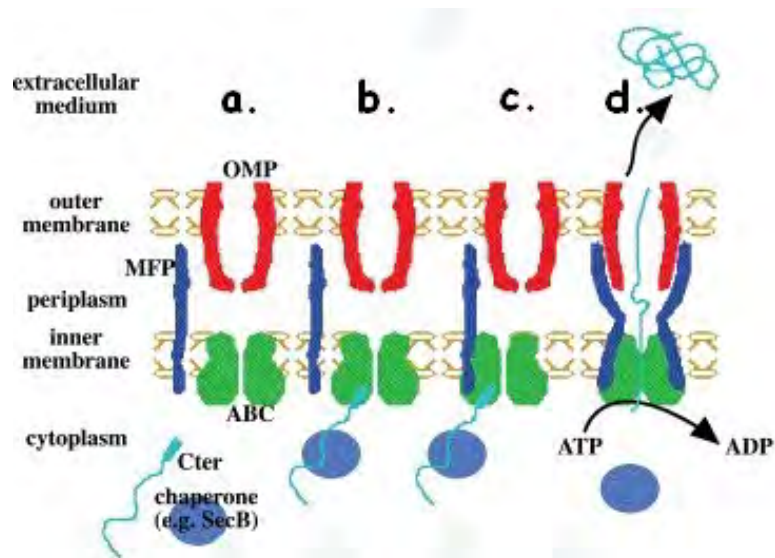


Figure 6 : Sécrétion d'une protéine via le système de sécrétion de type I. (a) Le substrat est ciblé dans le cytoplasme par une chaperone. (b) Celle-ci l'amène à la voie de type I ou l'extrémité C-terminale de la protéine est reconnue par le transporteur ABC, inséré dans la membrane interne. (c) Suite à la reconnaissance du substrat par le transporteur ABC, le MFP se lie au transporteur de la membrane interne et à l'OMP inséré dans la membrane externe afin de former un canal continu à travers l'enveloppe bactérienne. (d) Le substrat peut alors être exporté de la bactérie, l'ATP fournissant l'énergie nécessaire (Delepelaire 2004).

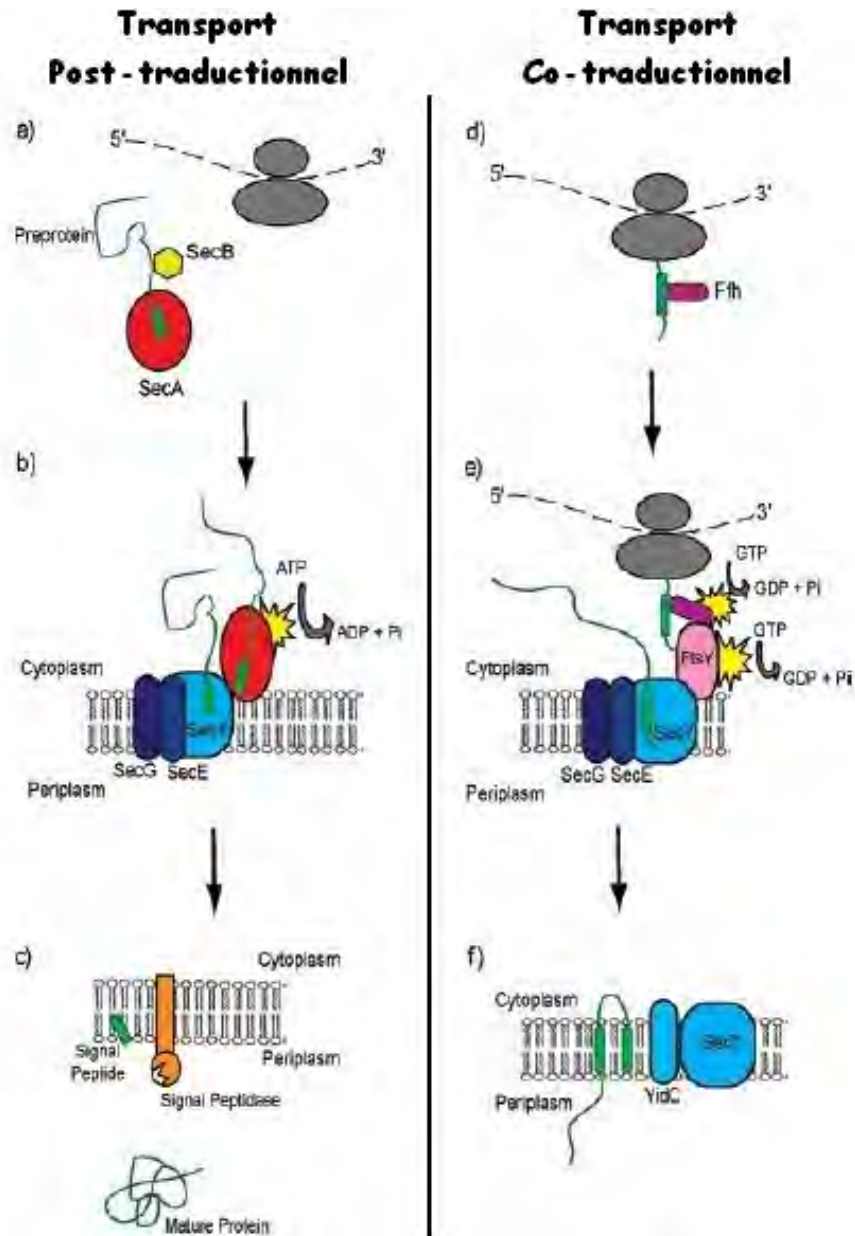


Figure 8 : Exportation de précurseurs par la voie Sec. Cette voie permet la translocation d'une protéine non repliée à travers la membrane interne de façon post-traductionnelle ou co-traductionnelle. Sécration post-traductionnelle. (a) Le précurseur est reconnu par la chaperonne SecB et amené à l'ATPase SecA. (b) SecA interagit avec le pore formé par SecYEG inséré dans la membrane interne et fournit l'énergie nécessaire à la translocation. (c) Dans le périplasme, le précurseur se replie pour former une protéine mature. Sécration co-traductionnelle. (d) La précurseur est reconnu à son extrémité N-terminale par SRP. (e) Fth amène le substrat à l'ATPase FtsY inséré dans la membrane interne à proximité du pore formé par SecYEG par lequel le précurseur est transloqué. (f) La protéine va alors soit s'insérer dans la membrane interne soit se replier dans le périplasme (Rusch and Kendall 2007).

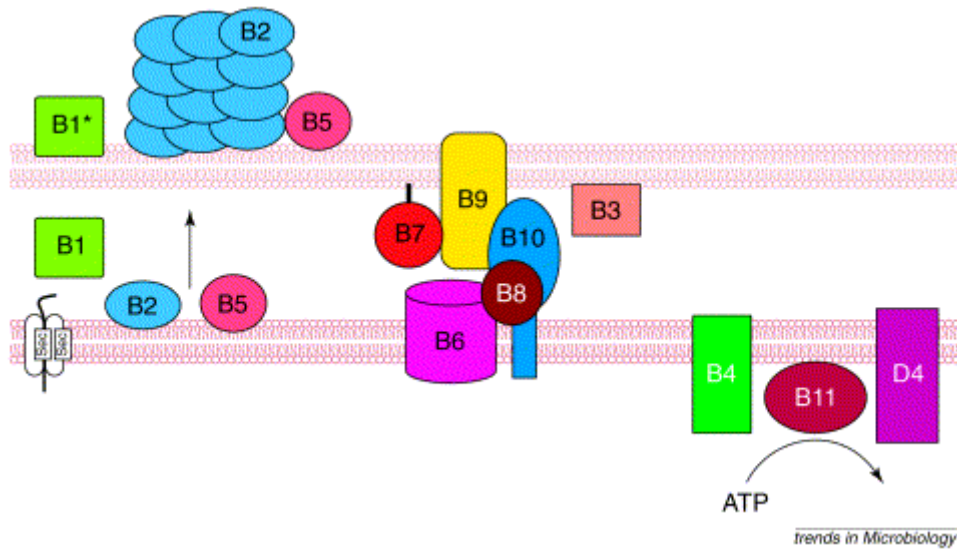
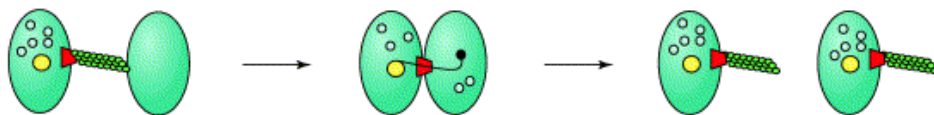
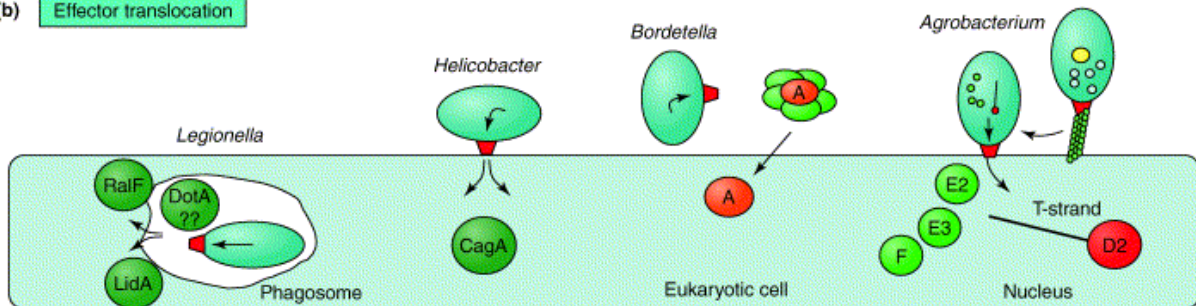


Figure 12 : Le système de sécrétion de type IV. Au niveau de la membrane interne du côté cytoplasmique, on retrouve les 3 ATPases VirB4, VirB11 et VirD4. Le complexe core inséré dans le membrane interne et externe et formant un canal continu à travers le périplasm est formé des protéines VirB6, B8, B10, B7, B9 et B3. Enfin, au niveau de la membrane externe, VirB2 et VirB5 forme un pilus qui permettra la sécrétion du substrat dans le milieu externe (Christie and Vogel 2000).

(a) **Conjugation**



(b) **Effector translocation**



(c) **DNA uptake or release**



Figure 13 : Les fonctions du système de sécrétion de type IV. (a) La conjugaison qui permet le transfert d'ADN sous la forme d'un complexe ADN-protéine via le pilus entre bactéries de la même espèce ou d'espèces différentes. (b) La translocation d'effecteurs qui permet aux bactéries pathogènes ou symbiotiques de libérer dans la cellule cible des effecteurs qui aideront à leur survie et leur réplication. (c) Transformation et libération d'ADN qui permettent l'échange d'ADN entre la bactérie et le milieu externe (Ding, Atmakuri et al. 2003).

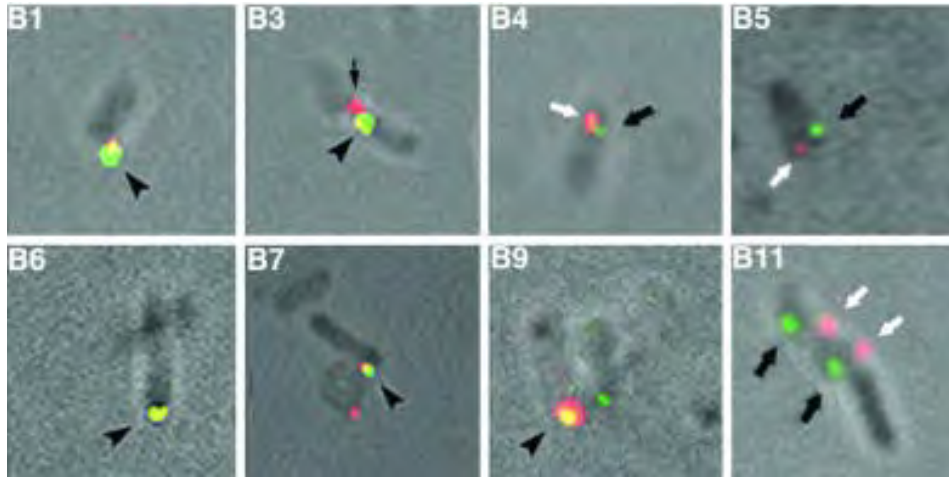


Figure 14 : Localisation de 8 protéines VirB avec VirB8 chez *Agrobacterium tumefaciens* par microscopie à immunofluorescence. Les têtes de flèches noires indiquent les colocalisations entre VirB8 et une autre protéine VirB. Les flèches noires indiquent les foci de protéines VirB et les flèches blanches les foci de protéines VirB8 qui ne se colocalisent pas. VirB1, B3, B6, B7 et B9 se colocalisent avec VirB8 au pôle de la cellule. VirB4, B5 et B11 ne se colocalisent pas avec VirB8 mais se localisent malgré tout au même pôle que celui-ci (Judd, Kumar et al. 2005).

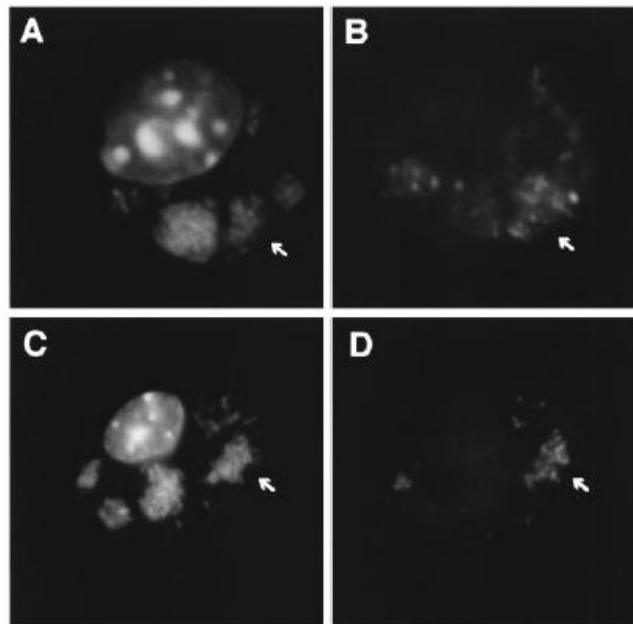


Figure 15 : Localisation des protéines DotH et DotO du système de sécrétion de type IV dans des macrophages contenant des *Legionella pneumophila* par microscopie à immunofluorescence. (A et C) Coloration au DAPI afin de visualiser les noyaux cellulaires. (B) Visualisation de la protéine DotH à la surface de la bactérie grâce à un anticorps anti-DotH. (D) Visualisation de la protéine DotO à la surface de la bactérie grâce à un anticorps anti-DotO. Les *L. pneumophila* ont été mis en présence de macrophages dérivés de la moelle épinière pendant 22heures (Watarai, Andrews et al. 2001).



Figure 16 : Cellule prédivisionnelle de *Caulobacter crescentus*. Cette bactérie se divise asymétriquement donnant naissance à 2 cellules filles morphologiquement et fonctionnellement distinctes (Skerker and Laub 2004).

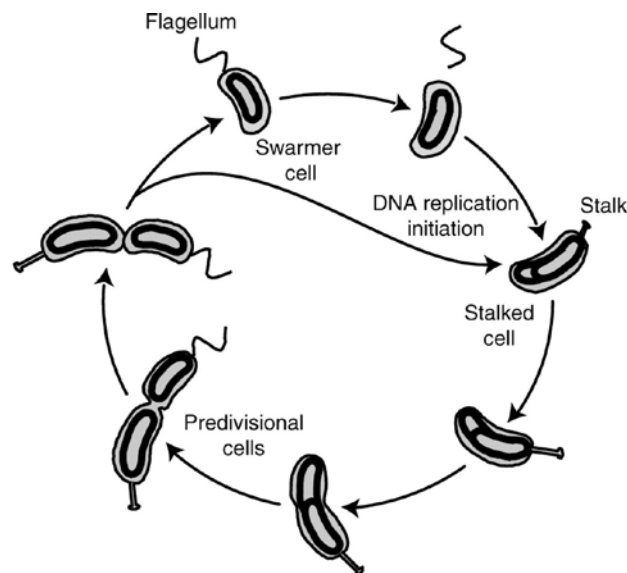


Figure 17 : Cycle cellulaire de *Caulobacter crescentus*. *Caulobacter* se divise de façon asymétrique formant une petite cellule flagellée mobile et une grande cellule pédonculée. Seule la cellule pédonculée peut se diviser en dupliquant ses chromosomes qui se déplacent chacun dans une cellule fille. Un flagelle est synthétisé au pôle opposé au pédoncule et un anneau de constriction permet la séparation des 2 cellules (Goley, Iniesta et al. 2007).

- Abdallah, A. M., N. C. Gey van Pittius, et al. (2007). "Type VII secretion--mycobacteria show the way." Nat Rev Microbiol **5**(11): 883-91.
- Christie, P. J. and J. P. Vogel (2000). "Bacterial type IV secretion: conjugation systems adapted to deliver effector molecules to host cells." Trends Microbiol **8**(8): 354-60.
- Cornelis, G. R. (2006). "The type III secretion injectisome." Nat Rev Microbiol **4**(11): 811-25.
- Davies, D. (2003). "Understanding biofilm resistance to antibacterial agents." Nat Rev Drug Discov **2**(2): 114-22.
- Delepelaire, P. (2004). "Type I secretion in gram-negative bacteria." Biochim Biophys Acta **1694**(1-3): 149-61.
- Dietmar Pum, A. N., Erika Gyoervary, Margit Sára, Uwe B. Sleytr (1999). "S-layer proteins as basic building blocks in a biomolecular construction kit."
- Ding, Z., K. Atmakuri, et al. (2003). "The outs and ins of bacterial type IV secretion substrates." Trends Microbiol **11**(11): 527-35.
- Filloux, A. (2004). "The underlying mechanisms of type II protein secretion." Biochim Biophys Acta **1694**(1-3): 163-79.
- Filloux, A., A. Hachani, et al. (2008). "The bacterial type VI secretion machine: yet another player for protein transport across membranes." Microbiology **154**(Pt 6): 1570-83.
- Goley, E. D., A. A. Iniesta, et al. (2007). "Cell cycle regulation in *Caulobacter*: location, location, location." J Cell Sci **120**(Pt 20): 3501-7.
- Henderson, I. R., F. Navarro-Garcia, et al. (2004). "Type V protein secretion pathway: the autotransporter story." Microbiol Mol Biol Rev **68**(4): 692-744.
- Journet, L., K. T. Hughes, et al. (2005). "Type III secretion: a secretory pathway serving both motility and virulence (review)." Mol Membr Biol **22**(1-2): 41-50.
- Judd, P. K., R. B. Kumar, et al. (2005). "Spatial location and requirements for the assembly of the *Agrobacterium tumefaciens* type IV secretion apparatus." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(32): 11498-503.
- Juhas, M., P. M. Power, et al. (2007). "Sequence and functional analyses of *Haemophilus* spp. genomic islands." Genome Biol **8**(11): R237.
- Kashefi, K., D. E. Holmes, et al. (2003). "Thermophily in the Geobacteraceae: *Geothermobacter ehrlichii* gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic member of the Geobacteraceae from the "Bag City" hydrothermal vent." Appl Environ Microbiol **69**(5): 2985-93.
- Rusch, S. L. and D. A. Kendall (2007). "Interactions that drive Sec-dependent bacterial protein transport." Biochemistry **46**(34): 9665-73.
- Skerker, J. M. and M. T. Laub (2004). "Cell-cycle progression and the generation of asymmetry in *Caulobacter crescentus*." Nat Rev Microbiol **2**(4): 325-37.

Watarai, M., H. L. Andrews, et al. (2001). "Formation of a fibrous structure on the surface of *Legionella pneumophila* associated with exposure of DotH and DotO proteins after intracellular growth." Mol Microbiol **39**(2): 313-29.